

Aus dem Bereich Innere Medizin
der Medizinische Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. med. Christoph Renner

**Konformationsanalyse von rekombinant
exprimierten, zellwandständigen HLA A2-
Komplexen auf
*Saccharomyces cerevisiae***

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2007**

vorgelegt von: Anne Litzenburger
geb. am 21. September 1978
in Saarbrücken

1. Zusammenfassung	1
1.1. Summary.....	2
2. Einleitung	3
2.1. Die Bedeutung von Krebserkrankungen.....	3
2.2. Nebenwirkungen konventioneller Therapieformen.....	4
2.3. Die Immuntherapie als Therapieoption.....	5
2.4. Die Vakzinierung.....	6
2.5. Strukturelle und funktionelle Betrachtung von MHC-Molekülen.....	7
2.6. Die Bedeutung der MHC-Tetramere.....	9
2.7. Hefeoberflächenexpression.....	11
2.8. Das Prinzip der Hefeoberflächenexpression.....	12
2.9. Ziele der Arbeit.....	13
3. Material und Methoden	14
3.1. Material.....	14
3.1.1. Geräte.....	14
3.1.2. Nährmedium für Bakterien.....	14
3.1.3. Nährmedium für Hefen.....	14
3.1.4. Bakterienstämme.....	15
3.1.5. Hefestämme.....	15
3.1.6. Puffer und Chemikalien.....	15
3.1.7. DNA-Molekulargewichtsmarker.....	18
3.1.8. Antikörper.....	18
3.1.9. Enzyme.....	19
3.1.10. Primer.....	19
3.1.11. Vektoren.....	20
3.1.12. Computersoftware.....	22
3.2. Methoden.....	23
3.2.1. Kultivierung von E. coli-Bakterien.....	23
3.2.2. Herstellung kompetenter Bakterien.....	23
3.2.3. Transformation.....	24
3.2.4. Hefekultivierung.....	24
3.2.5. Hefetransformation.....	24

3.2.6.	Herstellung eines DNA-Agarosegels	26
3.2.7.	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	27
3.2.7.1.	TENS-Methode für Mini-Plasmid-Prep.....	27
3.2.7.2.	Midi-Plasmid-Prep Methode.....	27
3.2.7.3.	Micro-Plasmid-Prep Methode.....	28
3.2.8.	Isolation von Plasmid-DNA aus Hefen.....	28
3.2.9.	Isolation von DNA aus Agarosegelen.....	29
3.2.10.	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	29
3.2.11.	Error Prone PCR.....	31
3.2.12.	Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	32
3.2.13.	Herstellung eines DNA-Sequenzgeles.....	33
3.2.14.	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	34
3.2.15.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	35
3.2.16.	Klonierung mit dem Zero Blunt® Topo® PCR Cloning Kit.....	35
3.2.17.	Photometrische Messung von Nukleinsäuren.....	35
3.2.18.	Messung der optischen Dichte von Zellkulturen.....	36
3.2.19.	Immunfluoreszenzfärbung von Hefen.....	36
3.2.20.	Zellsorting.....	37
3.2.21.	Mac-Sorting.....	39
4.	Ergebnisse	41
4.1.	Konstruktion des Hefeoberflächenexpressionsvektors pYD2.....	41
4.2.	Klonierung des pYD2- β_2 -Mikroglobulin-HLA A2 Konstruktes.....	42
4.3.	FACS-Analyse des pYD2- β_2 -Mikroglobulin-HLA A2 Konstruktes auf auf Hefen.....	44
4.4.	Klonierung des pYD2-HLA A2- β_2 Mikroglobulin Konstruktes.....	45
4.5.	FACS-Analyse des pYD2-HLA A2- β_2 -Mikroglubulin Konstruktes auf Hefeoberflächen.....	48
4.6.	Herstellung einer HLA A2-Mutantenbank.....	49
4.7.	FACS-Analyse der mutierten HLA A2-Bank.....	53
4.8.	FACS-Analyse der MACS-Anreicherung der mutierten HLA A2- Bank.....	55
4.9.	FACS-Parameter und Sortlogik.....	57
4.10.	Zellsorting der HLA A2-Mutanten-Bank.....	58

4.11. Zusammenfassende Übersicht.....	58
5. Diskussion	60
5.1. Lösungsstrategien durch Vektorumstellung.....	60
5.2. Single-chain Varianten.....	61
5.3. Umstellung der ursprünglich gewählten single-chain.....	62
5.4. Herstellung einer HLA A2-Mutanten-Bank als Lösungsstrategie.....	63
5.5. Konformationsänderung durch Glykosilierung.....	64
5.6. Mangelnde Antikörperbindung durch Glykosilierung.....	65
5.7. Ausblick.....	66
5.8. Alternative Expressionssysteme.....	66
6. Literaturverzeichnis	68
7. Danksagung	81
8. Lebenslauf	82

1. Zusammenfassung

Aufgrund der bisherigen Erfolge in den letzten Jahren und der sich weiterentwickelnden molekularbiologischen Technik nimmt die Immuntherapie von Krebserkrankungen einen immer größer werdenden Stellenwert in der Tumorforschung ein. Ein Forschungsschwerpunkt besteht im Bereich der spezifischen Antigenpräsentation durch MHC Klasse I-Moleküle, wodurch zytotoxische CD8⁺-Zellen aktiviert werden und so eine Zerstörung von Tumorzellen eingeleitet werden kann. Weitere wichtige Ansätze liegen in der Tumorstimmung und dem Einsatz von MHC-Tetrameren, welche für die Erforschung der komplexen Immunantwort von großer Bedeutung sind. Um eine mögliche Anwendung von rekombinant exprimierten single-chain HLA-A2 Molekülen in der Fluoreszenzanalyse und zum Zwecke der Vakzinierung zu überprüfen, wurden die single-chain-Konstrukte zellwandständig auf der Oberfläche der Hefe *Saccharomyces cerevisia* exprimiert. Dazu wurde ein Hefeoberflächenexpressions-System verwendet, welches als geeignete Methode gilt, um auch größere single-chain-Konstrukte stabil und effizient darzustellen.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Lösungsstrategien zur Herstellung korrekt gefalteter HLA A2-Proteine auf Hefeoberflächen entwickelt und diese mittels FACS-Analyse untersucht. Dies erfolgte in Form unterschiedlicher single-chain-Varianten. Diese Konstrukte unterschieden sich jeweils in der Lage der HLA-A2-heavy-chain und der β_2 -Mikroglobulin light-chain (β_2 -MG-Linker-heavy-chain; heavy-chain-Linker- β_2 -MG). Außerdem wurde die AGA 2-Position im Hefeoberflächenexpressionsvektor vom N-terminalen Ende an das C-terminale Ende verlagert. Der Einfluss dieser Veränderungen auf die HLA A2-Konformation wurde jeweils untersucht. Da diese Lösungsansätze zu keinem positiven Ergebnis führten und somit kein HLA A2-Protein mit korrekter Faltung exprimiert werden konnte, entwickelten wir eine HLA A2-Mutantenbank mittels „error prone PCR“ und homologer Rekombination. Allerdings konnte auch mit dieser Lösungsstrategie kein korrekt gefalteter HLA A2-Hefeklon durch FACSorting isoliert werden. Ein möglicher Grund für eine fehlerhafte Faltung könnte eine Konformationsänderung durch die Glykosylierung der Hefezellen sein. Außerdem könnten Kohlenhydratseitenketten am Protein eine Ursache für eine mangelnde Antikörperbindung sein. Somit würde die FACS-Analyse, selbst bei korrekter HLA A2-Konformation ein negatives Ergebnis liefern.

1.1. Summary

Conformational analysis of HLA-A2 complexes recombinantly expressed on the cell wall of *S. cerevisiae*

Immunotherapy is taking a constantly growing position in cancer research, because of previous success in the last few years and rapidly developing molecularbiological technologies. One key issue lies in the field of specific antigen presentation by MHC class I-molecules activating cytotoxic CD8+ cells to initiate killing of tumor cells. Tumor vaccination and the use of MHC-tetramers are other important approaches helping to understand the complex immune response. In order to study recombinantly expressed single-chain HLA-A2 molecules for fluorescence analysis and vaccination purpose, these single-chain-constructs were expressed on the surface of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. A yeast surface expression system was used as suitable method to express larger single-chain-constructs in a stable and efficient manner.

In the present thesis, different strategies were developed to produce properly folded protein in terms of protein conformation. Different single-chain variants were analyzed by flow cytometry. The constructs differ in HLA-A2 heavy-chain and β_2 -Microglobulin light-chain position (β_2 -MG-linker-heavy-chain; heavy-chain-linker- β_2 -MG). Besides, the Aga 2-position in yeast surface expression vector was shifted from N-terminal to C-terminal end. The influence of these changes on HLA conformation was investigated.

As these attempts did not lead to a positive result and no properly folded HLA-protein could be expressed, a HLA-mutant-library was generated by error-prone PCR and inserted into the expression vector via homologous recombination. Nevertheless, no properly folded HLA-A2 yeast clone could be isolated by FACSorting. Conformational changes because of yeast protein glycosylation could be one possible reason for incorrect protein folding. Additionally, glycosylation could be a reason for insufficient antibody binding, so that properly folded HLA-A2 protein could not be detected in flow cytometry.

2. Einleitung

2.1. Die Bedeutung von Krebserkrankungen

Mit der Zunahme der Lebenserwartung in den letzten Jahrzehnten hat sich auch das Spektrum der Todesursachen verändert. Standen zu Beginn dieses Jahrhunderts noch Infektionskrankheiten im Vordergrund, so sind es heute laut Todesursachenstatistik von 2003 vornehmlich Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, gefolgt von den bösartigen Tumorerkrankungen. Allein im Jahre 2003 waren fast ein Viertel aller Todesfälle auf ein Krebsleiden zurückzuführen (Statistisches Bundesamt, 2005).

Das Sterberisiko für Krebs steigt mit zunehmendem Alter. Das durchschnittliche standardisierte Sterbealter für Männer liegt bei 71,6 und für Frauen bei 69,8 Jahren. Krebs ist bei 35-69 jährigen Frauen und 45-64 jährigen Männern die häufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt, Robert-Koch-Institut, Gesundheitsbericht für Deutschland, 1998). Im Jahr 2000 starben in Deutschland 108 835 Männer und 100 349 Frauen an Krebs. Bei den Männern bildete der Lungenkrebs mit 26,8% die häufigste Todesursache unter den bösartigen Tumorerkrankungen, vor dem Darmkrebs mit 12,5%. Bei den Frauen dominierte der Brustkrebs mit 17,8%, ebenfalls gefolgt von Darmkrebs mit 15,3%. (Zeitschrift: „Krebs in Deutschland“; Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut, 4. Ausgabe, 2004).

Das Mammakarzinom zum Beispiel weist beim Auftreten von Fernmetastasen eine 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 10% auf. Für das bei Männern am häufigsten auftretende Bronchialkarzinom ergibt sich aufgrund der oftmals vorliegenden Inoperabilität bei Diagnosestellung mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 13% ebenfalls eine schlechte Prognose (Zeitschrift: „Krebs in Deutschland“; Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut, 4. Ausgabe, 2004). Können solide Tumoren vor einer Metastasierung durch chirurgische Maßnahmen nicht vollständig aus dem Körper entfernt werden, so ist ihre Prognose in der Regel infaust. Zusätzlich zur chirurgischen Entfernung von operablen Tumoren, wird heute bei einigen

Tumorarten die Strahlentherapie alleine oder als Kombination mit der Chemotherapie eingesetzt. Diese kombinierten Therapieformen bewirken zwar häufig eine höhere Heilungsrate, gehen allerdings auch zunehmend mit einer höheren Toxizität für den Körper einher.

2.2. Nebenwirkungen konventioneller Therapieformen

Neben der sehr schlechten Prognose verschiedener zum Teil inoperabler Krebserkrankungen kommt es bei vielen bisherigen Therapieoptionen, wie zum Beispiel bei der Chemotherapie und der Strahlentherapie, zu zahlreichen unerwünschten und teilweise erheblichen Nebenwirkungen (Kong et al., 2005). Die Nebenwirkungen durch die Chemotherapie erklären sich in erster Linie aus der generellen Regenerationshemmung rasch proliferierender Gewebe und betreffen insbesondere die Epithelien der Schleimhäute, was vor allem zu gastrointestinalen Beschwerden führt (Hato et al., 2004). Des weiteren sind häufig die Erythro-, Leuko- und Thrombopoese, die Gonaden, sowie die Haut und die Hautanhangsgebilde betroffen. Daneben treten des Öfteren unterschiedlich stark ausgeprägte Hyperurikämie und direkte, toxisch bedingte Organschädigungen vor allem am Herzen, Lunge, Leber und Nervensystem auf (Grothey, 2005). Als Folge der immunsuppressiven Wirkung muss mit häufigen Infektionen gerechnet werden.

Durch die Strahlentherapie kann es auf zellulärer Ebene zu Schäden der DNA kommen. Die Strahlenwirkung kann mit onkogenen Effekten verbunden sein, zu zellulären Funktionsstörungen führen, den Untergang der Zelle bewirken und in Keimzellen genetische Schäden bei den Nachkommen zur Folge haben. So kann zum Beispiel durch die kardiotoxische Wirkung einer thorakalen Radiotherapie des Mammakarzinoms eine erhebliche Pumpfunktionseinschränkung ausgelöst werden (Prosnitz et al., 2005).

Trotz des heutigen Standes der Forschung, gibt es nach wie vor Tumorerkrankungen, die weder auf eine Chemotherapie noch auf eine Strahlentherapie ansprechen und somit nur schlecht therapiert werden können. Vor

diesem Hintergrund besteht die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Therapieoptionen für bösartige Tumorerkrankungen.

2.3. Die Immuntherapie als Therapieoption

Die Immuntherapie von bösartigen Tumorerkrankungen ist eine der neuen Therapieoptionen, die aufgrund der molekularbiologischen Entwicklung der letzten Jahre einen immer größeren Stellenwert einnimmt. Beispielsweise gewinnt die Entwicklung von monoklonalen, gentechnisch hergestellten rekombinanten Antikörpern in der Onkologie zunehmend an Bedeutung und lässt auf verbesserte Therapieansätze hoffen. Der CD-20 Antikörper MabThera (DCI: Rituximab) wird heute bei der Behandlung von B-Zell-Lymphomen eingesetzt und konnte die Überlebenszeit der Krebspatienten deutlich verbessern (Penault-Llorca et al., 2002).

Zwei weitere neue Ansatzpunkte in der Therapie von Kolonkarzinomen sind der Epitheliale Wachstumsfaktor Rezeptor (epithelial growth factor receptor EGFR) und der Vasculäre Endotheliale Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor VEGF). Dabei blockiert Erbitux (DCI: Cetuximab) die Bindung des EGF und des TGF- α (transforming factor α) an den EGFR. Avastin (DCI: Bevacizumab) ist eine humanisierte Variante des monoklonalen anti-VEGF-Antikörpers und wird in der Behandlung von Kolonkarzinomen als antiangiogenetisches Krebstherapeutikum eingesetzt (Iqbal et Lenz, 2004).

Zu einer Steigerung der Überlebenszeit von Patientinnen mit Brustkrebs konnte der humanisierte monoklonale Antikörper Herceptin (DCI: Trastuzumab) beitragen. Dieser bindet an den Wachstumsfaktorrezeptor HER-2/neu, der bei einem Viertel der Krebspatientinnen überexprimiert vorliegt (Penault-Llorca et al., 2002; Baselga et al., 1999).

2.4. Die Vakzinierung

Ein weiterer viel versprechender Ansatz der Immuntherapie ist die Vakzinierung (Parminani et al., 2002). Die Basis für diese aktive Immuntherapie bildet die Identifikation von tumorassoziierten Antigenen (TAA), welche durch verschiedene menschliche Tumorarten exprimiert werden (Wang et al., 2005). Eine große Zahl der tumorassoziierten Antigene wurde durch Klonierung der T-Zell-Epitope (Boon and Old, 1997) und durch das SEREX-Verfahren (serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning) identifiziert (Sahin et al., 1995; Pfreundschuh 2000).

Bei der Vakzinierung werden die TAA über MHC Klasse I und MHC Klasse II auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) dargestellt. Werden diese durch spezifische T-Zellen erkannt, kann so eine aktive Immunantwort induziert und dadurch die Tumorzellen zerstört werden (Satthaporn et Eremin, 2001). Über die Präsentation der Peptidfragmente auf MHC Klasse I werden $CD8^+$ T-Zellen aktiviert (zytotoxische T-Lymphozyten; CTL), die dann über den T-Zell-Rezeptor in der Lage sind, das entsprechende Antigen auch auf MHC Klasse I Molekülen der Tumorzelle zu erkennen und die Tumorzelle mit Hilfe zytotoxischer Mediatoren zu attackieren. Über die Präsentation auf MHC Klasse II Molekülen werden $CD4^+$ T-Zellen aktiviert, die zum einen die B-Zelle zur Produktion von Antikörpern gegen das entsprechende Antigen anregen, zum anderen aber auch unerlässlich für die Aufrechterhaltung einer lang anhaltenden CTL-Immunantwort sind (Aruffo et al., 1993).

Der Einsatz der Vakzinierung zur Therapie unterschiedlicher Tumoren wie zum Beispiel T-Zell-Lymphomen (Seo et al., 2003), Brustkrebs (Allan et al., 2004) oder Hirntumoren (Soling et Rainov 2001) ist momentan zum Teil noch in der Erprobung, zeigt aber bereits weitreichende Ansätze.

Hindernisse einer erfolgreichen Vakzinierung sind unter anderem die strukturelle Veränderung der Tumorzellen als Antwort auf eine Immunreaktion oder auch das Ausbleiben einer Reaktion auf eine provozierte Immunantwort. Es besteht auch die theoretische Möglichkeit, dass durch die Vakzinierung mit tumorassoziierten Antigenen eine Autoimmunreaktion ausgelöst werden könnte (Matzku et Zoller,

2001). Ein weiteres Problem zeigt sich in der geringen Immunogenität humaner Antigene im Körper. Um diese zu steigern, werden mehrere Ansatzpunkte diskutiert. Darunter zählen der Einsatz von Adjuvantien chemischer Natur oder die Kopplung der Antigenpeptide an bakterielle Proteine. Eine weitere Überlegung die Immunogenität zu potenzieren, stellt die Bindung der TAA an eukaryontische Organismen, wie zum Beispiel Hefen dar (Mosolits et al., 2005).

2.5. Strukturelle und funktionelle Betrachtung von MHC – Molekülen

Die Antigenerkennung während der adaptiven Immunantwort wird neben den Immunglobulinen, die auf B – Zellen als Rezeptormoleküle dienen, durch antigenspezifische Rezeptoren der T – Zellen vermittelt. Da infizierte Zellen Peptidfragmente aus den Proteinen der Pathogene präsentieren, können T-Zellen die Anwesenheit intrazellulärer Pathogene erkennen. Die Peptide werden von spezialisierten Glykoproteinen der Wirtszelle an die Oberfläche gebracht und dort präsentiert. Diese Glykoproteine werden als Haupthistokompatibilitätskomplexe (major histocompatibility complex, MHC) bezeichnet. Peptide, die an MHC Klasse I gebunden sind, werden von CD-8⁺T-Zellen und solche, die an MHC Klasse II-Moleküle gebunden sind, von CD-4⁺T-Zellen erkannt (Germain, 1994).

MHC Klasse I ist ein Heterodimer und besteht aus 2 Polypeptidketten, einer α – oder schwere Kette, die sich durch die Membran erstreckt, und einer kleineren, nicht kovalent angelagerten leichten Kette, dem β_2 – Mikroglobulin, welches die Membran nicht durchspannt (Bjorkman et al., 1987). Das Molekül besitzt 4 Domänen, drei durch die α – Kette gebildet, nämlich α_1 , α_2 und α_3 , und das β_2 – Mikroglobulin (Abb. 1.1.). Die peptidbindende Stelle wird von der α_1 - und der α_2 – Domäne geschaffen, die durch ihre Faltung an der Oberfläche des Moleküls einen Spalt bilden (Madden, D. R., 1995) (Abb.1.1.).

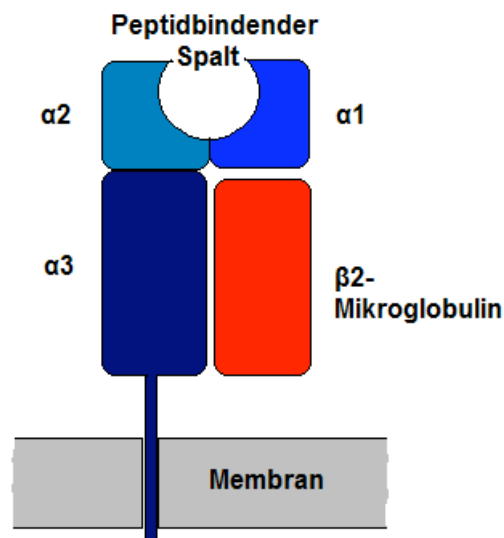


Abb.1.1.: Schematische Darstellung eines MHC Klasse I-Moleküls. Wie die Abbildung zeigt, ist das MHC Klasse I-Molekül ein Heterodimer einer α -Kette, die sich durch die Membran erstreckt und die nicht kovalent mit β_2 -Mikroglobulin assoziiert. Dieses durchspannt die Membran nicht. Die α -Kette faltet sich in drei Domänen α_1 , α_2 und α_3 .

Die 3 wichtigsten menschliche MHC Klasse I – Gene sind HLA A, HLA B und HLA C (Human Lymphocyte Antigen) (Bjorkman et al., 1985; Parham P. 1988). Pathogene werden begünstigt, wenn sie ihre Strukturgene so mutieren können, dass sie der Präsentation durch ein MHC – Molekül entgehen. Diesem Vorgehen stehen zwei Mechanismen entgegen: Erstens sind MHC polygen und somit ihre Eigenschaften und Merkmale durch die Beteiligung mehrerer Gene gekennzeichnet. Zweitens sind sie polymorph, d.h. Vielgestaltig in ihrer Struktur und können sich dadurch besser wechselnden Bedingungen anpassen. Diese beiden Phänomene wirken sich darauf aus, welches Spektrum an Peptiden gebunden werden kann und tragen so zur Fähigkeit des Immunsystems bei, auf eine Vielzahl von unterschiedlichen Pathogenen zu antworten (Parham et al., 1995).

Um die spezifische Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle auch für die Immuntherapie zu nutzen, wurden bereits funktionelle single-chain HLA A2-Moleküle hergestellt, welche kovalent ein tumorspezifisches Peptid binden und somit zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen aktivieren können. Dadurch kann eine peptidspezifische

CTL vermittelte Zerstörung von Tumorzellen eingeleitet werden (Oved et al., 2004). Die Möglichkeit der Herstellung von HLA-Molekülen mit der Fähigkeit zur tumorspezifischen Antigenpräsentation und Aktivierung zytotoxischer T-Zellen bilden einen weiteren bedeutungsvollen Aspekt in der Entwicklung der Immuntherapie.

2.6. Die Bedeutung der MHC-Tetramere

Antigenspezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen spielen bei der adaptiven Immunantwort eine entscheidende Rolle. Die Identifikation erfolgte bis zur Nutzung von MHC-Tetrameren nur indirekt über funktionelle Untersuchungen wie zum Beispiel der antigeninduzierten Zytokinsekretion und war damit ungenau und wenig spezifisch. MHC-Tetramere ermöglichen die selektive Erkennung, Isolation und Charakterisierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und legen damit einen Grundstein in der Erforschung der antigenspezifischen T-Zell-Immunantwort. Einzelne MHC-Peptid-Komplexe sind nicht in der Lage, stabile Bindungen mit T-Zellen einzugehen und diese zu aktivieren.

Diese Problematik kann durch den Einsatz von MHC-Tetrameren umgangen werden (Oved et al., 2004). Spezielle biotinylierte MHC-Monomere werden durch die Zugabe von Streptavidin, das 4 Biotinbindungsstellen besitzt, zu Tetrameren zusammengefügt. Der Gebrauch von fluorchrom-markiertem Streptavidin ermöglicht die Detektierung von T-Zell-Tetramer-Komplexen (Mallone et Nepom, 2004). Die Tetramertechnologie findet Anwendung in der Infektiologie (Appel et al., 2004) und in der Tumorummunologie. MHC-Tetramere wurden bereits in der Forschung mit viralen Antigenen und Tumorantigenen eingesetzt. Zum Beispiel wurden HLA A2-Tetramere mit Peptiden von Melanomassoziierten Antigenen beladen und zum Patientenmonitoring und zur Phänotypisierung benutzt (Monsurro et al., 2002; Mallone et Nepom 2004). Wie bereits erwähnt, bilden MHC-Tetramere eine wichtige Grundlage in der Entwicklung der Immuntherapie.

Für die Tumorummunologie sind unter anderem Cancer-Testis Antigene von besonderem Interesse. Diese werden normalerweise nur in Keimzellen exprimiert, kommen aber auch in verschiedenen Tumoren vor. Da im Hodengewebe kein MHC

Klasse I gebildet wird, werden diese Antigene nicht präsentiert. Daher ist eine Immunantwort gegen Cancer-Testis Antigene tumorspezifisch. Das NY-ESO-1 ist ein solches Antigen, das in zahlreichen Tumorarten, wie in Melanomen, Brustkrebs, Ovarial- und Lungenkrebs nachgewiesen werden konnte (Chen et al., 1997). Ursprünglich konnte das NY-ESO-1 mit Hilfe der SEREX-Technik (Serological analysis of recombinant tumor cDNA expression libraries) durch Screening einer Oesophaguskarzinom-Bank identifiziert werden. Bisher wurden verschiedene Peptide des NY-ESO-1-Proteins (155-163, QLSLLMWTT; 157-165, SLLMWTTQC; 157-167, SLLMWTTQCFL) in Verbindung mit dem HLA A0201 durch tumorreaktive CD8⁺ T-Zellen erkannt (Webb et al., 2004).

Allerdings scheint nur das NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Peptid eine Immunantwort auszulösen, bei der NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ /HLA A0201 exprimierende Tumore lysiert werden (Held et al., 2004). Um die NY-ESO-1-Peptid-Präsentation durch Tumorzellen genau zu untersuchen, wurden spezielle Antikörper-Fragmente entwickelt, welche spezifisch NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ /HLA A0201-Komplexe erkennen. Zur Selektion der richtigen Antikörper werden biotinylierte MHC-Tetramere verwendet (Held et al., 2004). Klinische Studien haben gezeigt, dass durch eine Immunisierung von Patienten mit NY-ESO-1 positiven Tumoren tumorspezifische T-Zell-Antworten ausgelöst werden können (Davis et al., 2004). Dies scheint ein weiterführender Ansatzpunkt in der Vakzinierung von Tumorpatienten zu sein.

Um menschliche MHC Klasse I-Tetramere (HLA A2) herzustellen, waren bisher allerdings aufwendige und zeitintensive Methoden notwendig. Es werden Protokolle beschrieben, bei denen zunächst die heavy-chain isoliert von der light-chain in verschiedenen Bakterienstämmen exprimiert werden müssen. Außerdem wird die Faltung der Proteinmonomere erst durch separate Reaktionen eingeleitet, wonach erst die Biotinylierung stattfinden kann. Im Anschluss können die MHC-Monomere zu Tetrameren formiert werden (Schumacher T., 2004). Aufgrund dieser aufwendigen Produktionstechniken wäre es hilfreich, einfachere Methoden zur Herstellung von Tetrameren zu entwickeln.

2.7. Hefeoberflächenexpression

Mit der Entwicklung der Hefeoberflächenexpressionssysteme mit *Saccharomyces cerevisiae* (Boder et Wittrup, 1997) wurde eine gute Alternative zu anderen direkten Expressionstechniken, wie zum Beispiel der Darstellungstechnik durch Phagen (Chiswell et McCafferty, 1992; Kondo et Ueda, 2004) gefunden. Hefen sind Eukaryonten und ähneln in der Prozessierung von Proteinen den menschlichen Zellen. Aufgrund dieser Eigenschaft sind sie zur Oberflächenexpression menschlicher Proteine besser geeignet als Prokaryonten (VanAntwerp et Wittrup, 2000; Esteban et Zhao, 2004). Ein weiterer Vorteil ist, dass Hefeoberflächenexpressionssysteme im Gegensatz zu Phagen groß genug sind, um mittels FACS (fluorescence-activated cell sorting) qualitativ und quantitativ analysiert zu werden (Boder et Wittrup, 1997; Boder et al., 2000, van den Beuken et al., 2003; Blaise et al., 2004; Wittrup 2004). Dadurch ist eine schnelle Isolation richtiger Klone mit den gewünschten Charakteristika (Kondo et Ueda, 2004) möglich. Mit Hilfe des FACSsortings (Feldhaus et al., 2003) oder der Magnetic Bead Capture-Methode (Yeung et Wittrup, 2002) in Kombination mit dem Hefeoberflächenexpressionssystem wurden schon zahlreiche Proteine mit hoher Stabilität und Affinität entwickelt. Zu dieser Gruppe zählen single-chain Antikörper (Boder et al. 2000; Feldhaus et al., 2003; Kieke et al., 1997), äußerst stabile single-chain T-Zell Rezeptoren (TCR) (Shusta et al., 2000; Holler et al., 2000, 2002) und single-chain TCR-Banken (Kieke et al., 1999). Von Schweickhardt et al. (2003) wurden auch Mutanten des Tumornekrose-Faktors alpha (TNF α) mit einer hohen Expressionsrate auf der Hefeoberfläche dargestellt.

Das Hefeoberflächenexpressionssystem kam auch bei der Entwicklung der serologischen Identifikation von tumorassoziierten Antigenen zum Einsatz (Wadle et al., 2005) und wurde bereits zur Darstellung von single-chain HLA (human lymphocyte antigen) Klasse II verwendet. Dabei hat man eine Mutantenbank durch zufällige Mutagenisierung erstellt und mit Hilfe der FACS-Analyse (Scott et al., 2003) und den entsprechenden Antikörpern die Klone mit korrekter Proteinkonformation aussortiert (Esteban et Zhao, 2004). 2003 zeigten Brophy et al., dass Hefeoberflächenexpressionssysteme für die Expression verschiedener Formen von murinen MHC-Peptid-Komplexe verwendet werden können.

2.8. Das Prinzip der Hefeoberflächenexpression

Um Proteine zu exprimieren, zu sezernieren und auf die extrazelluläre Matrix zu translozieren, bedient man sich des α -Agglutinin-Rezeptors (Watzle et al., 1988). Dieser wird kodiert durch das AGA1- und das AGA2-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* und fungiert als Adhäsionsmolekül für die Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten bei Paarungsvorgängen von komplementären Hefezellen. Der α -Agglutinin-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, dem Aga1p und dem Aga2p. Das Aga 1 Protein (Aga 1p, 725 Aminosäuren) wird von der Hefezelle sezerniert und geht eine kovalente Bindung mit dem β -Glukan der extrazellulären Matrix der Zellwand ein (Lu et al. 1995). Das Aga 2 Protein (Aga 2p, 69 Aminosäuren) ist kovalent mit dem Aga 1p durch 2 Disulfidbrücken verbunden (Cappellaro et al., 1991, 1994). Das N-terminale Ende des Aga 2p bildet die Bindungsstelle zum Aga 1p und das C-terminale Ende ist für die Fusion mit dem Peptid/Protein vorgesehen, das auf der Oberfläche exprimiert werden soll (Boder et Wittrup 1997) (Abb. 1.2.).

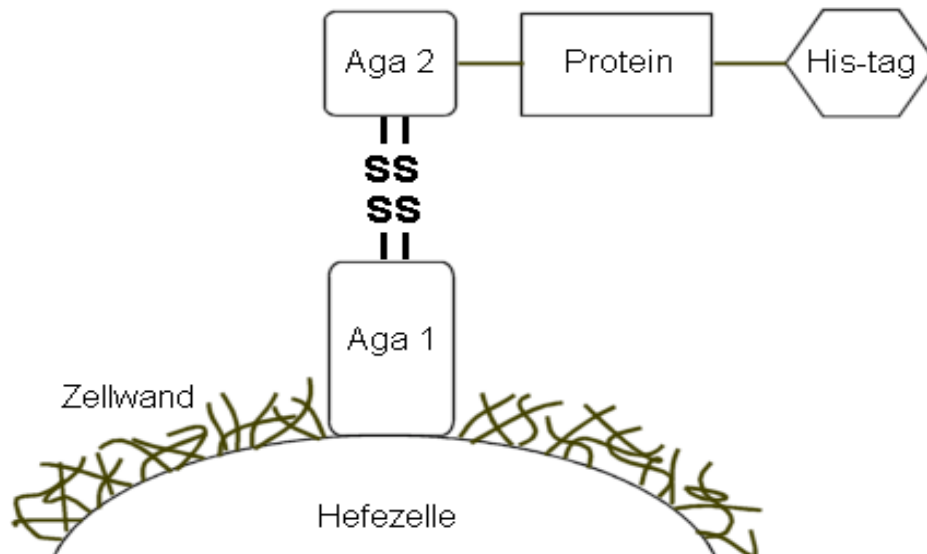


Abb.1.2.: Schematische Darstellung des Hefeoberflächenexpressionssystems. Weitere Erläuterungen siehe Text unter 2.8..

2.9. Ziele der Arbeit

Als recht viel versprechendes Therapieverfahren stellt die Immuntherapie eines der Hauptziele in der Tumorforschung der letzten Jahrzehnte dar. Um die Erforschung dieser experimentellen Therapieform voranzutreiben, ist der Einsatz von HLA-Tetrameren unter anderem zur Entwicklung von peptidspezifischen Antikörpern unerlässlich. Aufgrund der aufwendigen und teuren Produktion wäre es von Bedeutung, geeignete Methoden für eine günstige und einfache Herstellung zu entwickeln. Ein möglicher Weg könnte darin bestehen, HLA A2-Moleküle als single-chain-Konstrukt auf Hefeoberflächen zu exprimieren. Diese könnten als Tetramerersatz verwendet werden. Somit könnte man auf eine einfachere und günstige Weise große Mengen an HLA A2-Protein herstellen und diese für weitere Forschungsschritte verwenden. Außerdem könnten die exprimierten HLA A2-Moleküle zur Antigenpräsentation bei Peptidvakzinierungsexperimenten eingesetzt werden und zudem die Immunogenität durch den adjuvanten Effekt der Hefezellwand zusätzlich gesteigert werden.

In dieser Arbeit wird der mehrfach frustrane Versuch beschrieben, im Hinblick auf die Proteinkonformation korrekt gefaltete HLA A2-Moleküle auf der Zelloberfläche von *Saccharomyces cerevisiae* zu exprimieren. Dabei werden mehrere Lösungsstrategien für die Problematik der falschen Proteinkonformation der HLA A2-Moleküle aufgezeigt und diskutiert.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Sequenzierautomat	LI-COR™ DNA sequenzer model 4000L Rev. 02.23 (MWG™, München)
FACS-Analyser	Becton Dickinson™ FACScan®
MACS-Seperator	Miltenyi-Biotec (Bergisch-Gladbach)
Cell-Sorter, Moflo	Dako Cytomatik
Laser	Cohent, Innova 70 C
Gene Pulser	Biorad

3.1.2. Nährmedium für Bakterien

LB (Luria-Bertani) Medium besteht aus 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt und 1% (w/v) NaCl, der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt. Bei LB (Luria-Bertani) Platten werden 15 g Agar auf einen Liter H₂O gegeben und danach autoklaviert. Bei Transformationen mit ampicillinresistenten Vektoren, wurde das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin) in einer Endkonzentration von 0,1 g/l zugegeben.

3.1.3. Nährmedium für Hefen

Minimal Dextrose-Platten bestehen aus 0,67% (w/v) YNB (mit Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren), 2% (w/v) Glucose, 0,01% (w/v) Leucin und 1,5% (w/v) Agar. YNB und Agar werden mit H₂O_{dest} autoklaviert, Glucose und gelöstes Leucin steril filtriert und dann die Platten gegossen. YNB-CAA Medium besteht aus 0,67% (w/v) YNB (Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren), 2% (w/v) Glucose bzw. Galaktose und 0,5% (w/v) Casaminosäuren. Penicillin und Streptomycin werden zum Schutz vor Bakterien zugegeben. YPD-Medium besteht aus 1% (w/v) Hefe-Extrakt, 2% (w/v) Pepton und 2% (w/v) Glucose. Die entsprechenden YPD-Platten werden durch die Zugabe von 2% (w/v) Agar zu YPD-Medium hergestellt.

3.1.4. Bakterienstämme

Zur Plasmidamplifikation wurde der *Echerischia coli*-Stamm DH5 α (Woodcock et al. 1989) eingesetzt.

3.1.5. Hefestämme

Für die Transformation, die Rekombination und die Expression von HLA A2 auf Hefeoberflächen wurde der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm EBY-100 verwendet.

3.1.6. Puffer und Chemikalien

Ladepuffer (10x) für DNA-Agarosegelelektrophorese (Blaumarker)	10% 10x TAE 70% Glycerol einige Kristalle Bromphenolblau einige Kristalle Xylencyanol 20% 200 mM EDTA, pH=8
Ladepuffer für die Sequenzgelelektrophorese	5% deionisiertes Formid 1% 50 mg/ml Dextran-Blau in 25 mM EDTA, pH=8
Ligasepuffer (10x) für T4 DNA-Ligase	660 mM Tris-HCl 50 mM MgCl ₂ 50 mM DTT 10 mM ATP, pH=7,5 (20°C)
O ⁺ Puffer (10x) für Restriktionsendonukleasen	50 mM Tris-HCl, pH=7,5 10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 0,1 mg/ml BSA

PBS-Puffer (phosphate-buffered saline)	140 mM NaCl 25 mM KCL 5 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 10 mM Na/K-Phosphat, pH=7
Reaktionspuffer (10x) für die ProofStart™ Polymerase:	15 mM MgSO ₄ KCl Tris-Cl, Triton X-100 (NH ₄) ₂ SO ₄ ph=8,7
Reaktionpuffer (1x) für die Taq-Polymerase (BioLabs®)	10 mM KCl 2 mM MgSO ₄ 20 mM Tris/HCl, pH=8,8; 25°C 0,1% Triton X-100 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
R ⁺ Puffer (10x) für Restriktionendonukleasen	10 mM Tris-HCl, pH=8,5 10 mM MgCl ₂ 100 mM KCl 0,1 mg/ml BSA
TAE-Puffer (50x)	2 mM Tris-HCl 0,25 mM NaAcetat 0,5 mM EDTA Eisessig, pH=7,8
Transformationspuffer	10 mM Tris/HCl, pH=8 50 mM CaCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 10 mM MgCl ₂

Ethidiumbromid	Lösung für die Zugabe zu Agarosegelen in einer Verdünnung von 1:1000 der Stammlösung (10 mg/ml)
GFX PCR DNA und Gel-Banden Aufreinigungskit (Amersham):	
• Capture-Puffer:	Gepufferte Lösung mit Acetat und chaotropen Salzen
• Waschpuffer:	Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris/HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA); vor Gebrauch mit Ethanol auf eine Endkonzentration von 80% auffüllen
DTT-Lösung:	1 M Tris; 2,5 M DTT, pH 8,0
Selektivmedium (SC):	SD + CAA
Komponenten der Hefetransformation nach Gietz :	
• SS-Träger-DNA (Single-stranded Carrier-DNA)	200 mgs hochmolekulare DNA (Sodium Salt Type III from Salmon Testes, Sigma D1626)
• LiAC 1 M	Sterilfiltriertes Lithium Acetat mit destilliertem, deionisiertem Wasser, pH= 8,4-8,9
• Polyethyleneglycol (PEG):	MW 3350 (Sigma P3640), 50% (w/v) mit destilliertem, deionisiertem Wasser, sterilfiltriert
• YPAD-Medium (Yeast Extract- Peptone-Dextrose plus Adenine)	6 mg Hefeextrakt, 12 mg Pepton, 12 mg Glucose, 60 mg Adeninhemisulfat 600 ml H ₂ O _{dest} , 10 g Bacto-Agar

3.1.7. DNA-Molekulargewichtsmarker

Als DNA-Längenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder (#SM0311/2/3) und der GeneRuler™ 100 bp DNA-Ladder Plus (#SM0321/2/3) von MBI Fermentas verwendet. Beide Längenmarker wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

3.1.8. Antikörper

Tab. 1: Verwendete Antikörper mit ihrer Verdünnung und den entsprechenden Herstellerangaben.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
HLA-ABC Monoclonal Mouse Anti-Human Antigen; Klon W6/32	1:100	Dako Cytomatik
Rabbit Anti-Human Beta- 2-Mikroglobulin	1:500	Dako
Mouse BB7.2 Anti-HLA A2-heavy-chain	1:100	Bereitgestellt von Karen Anderson; Dana Farber Cancer Institute Boston
Biotin-SP-conjugated Anti-Rabbit IgG	1:200	Jackson ImmunoResearch
Biotin-SP-conjugated Anti-Mouse IgG	1:200	Jackson ImmunoResearch
R-Phycoerythrin+- conjugated Streptavidin	1:200	Jackson ImmunoResearch
Mouse Anti-His	1:500	Stook, Quiagen

3.1.9. Enzyme

Taq-Polymerase	Quiagen (Hilden)
ProofStart™ DNA-Polymerase	Quiagen (Hilden)
T4 DNA-Ligase	Roche
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
	EcoRI 10u/μl, 5000u ...G!AATTC...
	XhoI 10u/μl, 2000u ...C!TCGAG...
	BamHI 10u/μl, 4000u ...G!GATCC...
	HindIII 10u/μl, 5000u ...A!AGCTT...

3.1.10. Primer

Sequenzierung (HLA A2):

pYD1 Pst/GS 5`seq: 5`-CTG CAG GCT AGT GGG GGA GG- 3`

pYD1 3`Vektor neu: 5`-GTC GAT TTT GTT ACA TCT ACA CTG- 3`

PCR (Beta-2-Mikroglobulin):

beta2 MG 5`Bam: 5`-GGG GGA TCC ATC CAG CGT ATC CCA AAG ATT CAG -3`

beta2 MG 3`Bam: 5`-GGG GGA TCC CAT GTC TCG ATC CCA CTT AAC TAT -3`

Sequenzierung (pYD2-HLA A2-Beta-2-Mikroglobulin):

3`Aga2 seq: 5`-GAT TTG CTG GCA TAT AGT TGT CAG- 3`

pYD1 Pst/GS 5`seq: 5`-CTG CAG GCT AGT GGG GGA GG- 3`

pYD1 3`Vektor neu: 5`-GTC GAT TTT GTT ACA TCT ACA CTG- 3`

PCR (pYD3-Beta-2-Mikroglobulin-rekomb.)

5`pYD3 Eco/Xho rek.:

5`-GTT TTA GCA CAG GAA CTG AAG CTT CTG CAG GCT AGT GGG GGA GGT
GGC TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGA GGT GGC GGG TCT GAA TTC CTC- 3`

3`-pYD3 Eco/Xho rek.:

5`-GGA TCC TGC TTC TGA AAA TTC ACC TTC TTC CTC GAG GAA TTC AGA
CCC GCC ACC- 3`

Sequenzierung (pYD3-Beta-2-Mikroglobulin-rekomb.):

T7 Promotor 5'β: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

Error-prone PCR auf HLA A2:

5'HLA-A2mut rekomb.:

5'-GGA GGT GGG TCT GAA TTC GGC TCT CAC TCC ATG AGG-3'

3'HLA-A2mut rekomb.:

5'-CTG AAA ATT CAC CTT CTT CCT CGA GTC CAG AAG GCA CCA C- 3'

3.1.11. VektorenDer Hefeoberflächenexpressionsvektor pYD3

Aga2 signal peptide

Nhe mut. gen.

ATG CAG TTA CTT CGC TGT TTT TCA ATA TTT TCT GTT ATT **GCT AGC** GTT TTA GCA
cl. site

Start Aga 2

1 2 3 **HindIII** **PstI** 1. Linker Glycin-Serin
 CAG GAA CTG **AAG CTT CTG CAG** GCT AGT GGG GGA GGT GGC TCT GGT GGT GGT

EcoRI

recombination site

GGT TCT GGA GGT GGC GGG TCT **GAA TTC** CAC CCA AGC AGT GGT ATC AAC GCA

SmaI

GAG TGG CCA TTA TGG **CCC GGG** AAA AAA CAT GTC GGC CGC CTC GGC CTC GGT

XhoI

2. Linker Yol Epitop

AGG GTG GGC ATC GAT ACG AGA TCC ATC GAG **CTC GAG** GAA GAA GGT GAA TTT

BamHI

c-myc

TCA GAA GCA **GGA TCC** GAG CAA AAC CTC ATT TCT GAA GAC TTG

Start Aga2

CAG GAA CTG ACA ACT ATA TGC GAG CAA ATC CCC TCA CCA ACT TTA GAA TCG
 ACG CCG TAC TCT TTG TCA ACG ACT ACT ATT TTG GCC AAC GGG AAG GCA ATG
 CAA GGA GTT TTT GAA TAT TAC AAA TCA GTA ACG TTT GTC AGT AAT TGC GGT TCT
 CAC CCC TCA ACG Rct AGC AAA GGC AGC CCC ATA AAC ACA CAG TAT GGT TTT

8 x HIS

*

PmeI

*

*

CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA **GTT TAA ACC** CGC TGA TCT gAT ACC aAC
 AGT GTA GaT GTA ACA AAA TCG ACT

Abb. 3.1.: Auszug aus der Vektorkarte des Hefeoberflächenexpressionsvektors pYD3. Erläuterungen siehe Text.

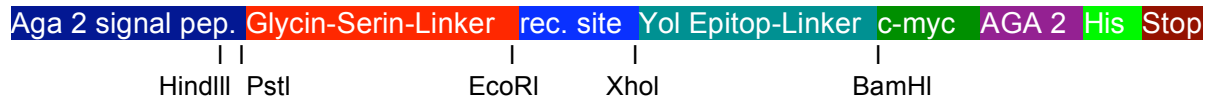


Abb. 3.2.: Schematische Darstellung des exprimierten Anteils des Hefeoberflächen-expressionsvektors pYD3. Erläuterungen siehe Text.

Der pYD2-Vektor ist ein Hefeoberflächenexpressionsvektor, der von uns aus dem pYD1-Vektor konstruiert wurde. Der pYD1-Vektor (Invitrogen) wurde konzipiert, um Proteine zu exprimieren, zu sezernieren und auf die extrazelluläre Matrix zu translozieren. Dabei bedient man sich des α -Agglutinin-Rezeptors, codiert durch das AGA 2-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dieser fungiert als Adhäsionsmolekül für die Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten bei Paarungsvorgängen mit Hefezellen des komplementären Paarungstyps. Der α -Agglutinin-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten Aga2p und Aga1p, die durch Disulfidbrücken kovalent verknüpft sind. Aga1p sorgt für die Anheftung an die Zelloberfläche, während an den carboxy-terminalen Teil von Aga2p das darzustellende Protein fusioniert ist (Abb.2). Des weiteren enthält der Vektor ein für das AGA 2-Gen zuständiges durch Galactose induzierbaren Promotor, ferner ein V5-Epitop sowie ein 6x His-Tag zur Detektion. Zur Selektion und Replikation in *E. coli* dient ein Ampicillinresistenzgen und pUC-Origin.

Der Klonierungsvektor PCR[®]-Blunt II-Topo[®] (Invitrogen)

Dieser Vektor wird zur schnellen blunt-end Ligation von PCR-Produkten verwendet und dient somit als „Reservoir“ des amplifizierten DNA-Fragmentes, das schnell transformiert, geprept und verdaut werden kann. Als Selektionsmarker wird hier für prokaryontische Systeme ein Gen für Kanamycin-Resistenz eingesetzt. Der Klonierungsvektor wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.1.12. Computersoftware

Zur Datenerfassung der FACS-Messungen wurde BD CELLQuest® (für Apple™ PowerMac®) verwendet.

Die Analyse der erhaltenen FACS-Daten und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm WinMDI®, Version 2.8.

Die Datenerfassung der Sequenziergelelektrophorese erfolgte mit dem Programm LI-COR™ BASE IMAGIR® Data Collection Vers. 02.31, die Auswertung mit dem Programm LI-COR™ BASE IMAGIR® Image Analysis Vers. 04.0h (unter IBM™ OS/2 warp4®).

Die DNA-Sequenzen wurden mittels der Internet-basierten Sequenzdatenbank BLASTN (= Standard nucleotide BLAST / BLAST = Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., 1997) am NCBI (= National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health (NIH), USA).

Für die schriftliche Ausarbeitung der Arbeit wurde Microsoft Word 2000 verwendet. Tabellen wurden mit Microsoft Excel für Windows® XP erstellt. Schaubilder und Graphiken wurden mit Hilfe von Microsoft Powerpoint dargestellt.

3.2. Methoden

3.2.1. Kultivierung von E.coli-Bakterien (Maniatis et al., 1989)

Die Kultivierung von E.coli-Bakterien erfolgte in LB-Medium. Zur Selektion und Amplifikation transformierter Bakterien sind dem Medium die Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (30 µg/ml) (in Abhängigkeit von den Resistenzeigenschaften der verwendeten Vektoren) zugesetzt worden.

Es wurden 50 ml LB-Medium mit 20 µl einer transformierten Bakterienkultur angeimpft. Das aerobe Wachstum erfolgte über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C. Für Plattenkulturen wurden LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion transformierter Bakterien gegossen. Die Bakterien wurden mit einem sterilen Drigalski-Spatel oder einer gebogenen Pasteurpipette auf den Plattenoberflächen verteilt. Das Wachstum erfolgte ebenfalls über Nacht bei 37°C im Brutraum.

3.2.2. Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl₂/RbCl-Methode; Kushner, 1978)

Als kompetente Bakterien werden Stämme bezeichnet, die eine erhöhte Fähigkeit besitzen, während einer Transformation Fremd-DNA aufzunehmen. Es wurden 30 ml LB-Medium mit 50 µl der entsprechenden Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C im Brutraum geschüttelt. Am folgenden Morgen wurden 8 ml entnommen und in 200 ml neues LB-Medium pipettiert. Die Kultivierung erfolgte so lange, bis eine optische Dichte (OD) von ca. 0,3 bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen wurde. Anschließend wurde die Kultur auf 4 Aliquots à 50 ml aufgeteilt, 15 min auf Eis inkubiert und dann bei 4°C und 4000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus Instruments) zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden in je 16 ml Transformationspuffer resuspendiert, erneut 15 min auf Eis gestellt und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Nun wurden die Bakterienpellets in je 4 ml Transformationspuffer aufgenommen, unter Zugabe von 50% Glycerol zu je 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Stämme wurden bei -80°C gelagert.

3.2.3. Transformation (Lederberg et Cohen, 1974)

Als Transformation wird eine Methode bezeichnet, bei der gelöste DNA in eine Bakterienzelle übertragen wird. Pro Transformationsansatz werden 80 µl einer tiefgefrorenen und auf Eis aufgetauten Bakterienkultur mit 4 µl einer Plasmid-DNA vorsichtig vermischt. Während einer halbstündigen Inkubation auf Eis, lagert sich die negativ geladene DNA spontan an die Zellwände der Bakterien an. Durch einen Hitzeschock von 45 s bei 42°C wird die Zellmembran der Bakterien kurzzeitig permeabel und die DNA kann ins Innere der Zelle gelangen. Nach einer kurzen Regeneration auf Eis wird der Vorkultur 250 µl SOC-Medium zugegeben und unter heftigem Schütteln für 30 min bei 37°C inkubiert. Dabei bauen die transformierten Bakterien die durch das aufgenommene Plasmid neu erworbenen Resistenzeigenschaften auf. Danach erfolgt die Kultivierung der Bakterien auf LB-Platten, wobei das den Resistenzeigenschaften entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde. Eine Negativkontrolle wurde ohne Zugabe von DNA durchgeführt.

3.2.4. Hefekultivierung

Flüssigkulturen transformierter Hefen wurden zunächst bei 30°C 24-48h in CAA+Glucose-Medium unter Schütteln inkubiert, danach zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und zur Induktion der Oberflächenexpression in das gleiche Volumen CAA+Galaktose gegeben. Die Inkubation unter Schütteln dauert hierbei 24-48 h bei 20°C. Für die Kompetentmachung nach dem Invitrogenprotokoll wurde YPD-Vollmedium verwendet, nach dem Clontechprotokoll für die Transformation der cDNA-Bank wurde YPDplus verwendet. Die transformierten Hefen wurden auf MD-Leu-Agarplatten ausplattiert und bei 30°C mehrere Tage inkubiert.

3.2.5. Hefetransformation (Gietz et Woods , 2002)

Mit diesem Protokoll können die Bedingungen einer Hefetransformation bestimmter Stämme optimiert werden, um so eine hohe Transformationseffizienz zu erhalten. Zum Beispiel können mit diesem Protokoll Plasmidbanken in einen Hefestamm

transformiert werden. Eine gleichzeitige Transformation zweier verschiedener Plasmide ist mit dieser Methode ebenfalls möglich.

Es wurden 5 ml Flüssigmedium (1x YPAD oder Selektionsmedium) mit dem Hefestamm EBY 100 beimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 200 rpm und 30°C inkubiert. Zur gleichen Zeit wurden ebenfalls 2x YPAD und ein 250 ml Kolben in einem Inkubator bei 30°C vorgewärmt. Am nächsten Tag wurden 10 ml der Hefekultur mit 1 ml Wasser verdünnt und photometrisch die optische Dichte (OD) bei 600 nm gemessen. Als nächstes wurden 50 ml des vorgewärmten 2x YPAD in den vorgewärmten Kolben gegeben und soviel von der Hefekultur zugegeben, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht wurde. Anschließend wurde der Kolben auf einem Schüttler bei 30°C und 200 rpm inkubiert. War nach etwa 4 Stunden eine OD₆₀₀ von 2,0 erreicht, wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 3000 g über 5 min geerntet, in 25 ml sterilem Wasser gewaschen und in einem weiteren ml resuspendiert. Während die Zellen geerntet wurden, wurde eine 1 ml Probe der Träger-DNA für 5 min aufgekocht und danach in einem Eiswasserbad abgekühlt. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt, für 30 s zentrifugiert, der Überstand verworfen und so viel Wasser zugegeben, bis ein Endvolumen von 1 ml erreicht wurde, in dem die Hefezellen wieder resuspendiert wurden. Anschließend wurden für jede Transformation 100 µl der Probe (etwa 10⁸ Zellen) in neue 1,5 ml Röhrchen pipettiert, für 30 s bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Der gewünschten Zahl der Transformation entsprechend, wurde der Transformationsmix vorbereitet und auf Eis gestellt.

Tab. 2: Pipettierschema zur Hefetransformation in Abhängigkeit von der Zahl der Transformationen.

Komponenten	Transformationen		
	1	5 (6x)	10 (11x)
PEG 3500 50 %	240 µl	1440 µl	2640 µl
LiAc 1.0 M	36 µl	216 µl	396 µl
Gekochte SS-Träger-DANN	10 µl	300 µl	550 µl
Plasmid-DNA + H ₂ O _{dest}	74 µl	204 µl	374 µl

Es wurden 360 µl des Transformationsgemisches in jedes Transformationsröhrchen gegeben und die Zellen durch heftiges Vortexen resuspendiert und für 90 min in einem 42°C warmen Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Probe für 30 s und mit Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert und das Transformationsgemisch abpipettiert. Das Pellet wurde unter vorsichtigem Rühren mit einer Pipettenspitze und unter vortexen mit 1 ml Wasser vermischt. Es wurden geeignete Suspensionsverdünnungen auf SC-Medium (Selektionsmedium) ausplattiert und für 3 bis 4 Tage bei 30°C inkubiert, wobei die Zahl der Transformationen bestimmt wurde. Um zwei Plasmide in eine Zelle zu transformieren, können beide Plasmide zusammen in die gleiche Transformationsreaktion gegeben werden.

3.2.6. Herstellung eines DNA-Agarosegels

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten bis 10 kb wurden 1%ige Agarosegele und für einen Trennbereich von 0,1 -2 kb wurden 3%ige Gele hergestellt und verwendet. Die jeweils berechnete Menge an Agarose für 100 ml 1xTAE-Puffer wurde durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Auffüllung der verdunsteten Wassermenge mit autoklaviertem H₂O und Abkühlung auf etwa 60°C wird 100 µl Ethidiumbromid (1:100) zugegeben. Das Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleinsäuren, wodurch diese unter UV-Licht als fluoreszierende Banden sichtbar werden und fotografisch dokumentiert werden können. Die Agaroselösung wurde luftblasenfrei auf einen dafür vorgesehenen Agaroseträger aus Kunststoff gegossen. Um ein Auslaufen der Lösung zu vermeiden, wurde der Zwischenraum zwischen Rahmen Kunststoffplatte zuvor mit Agarose abgedichtet. Unmittelbar nach dem Gießen wurde an beiden Enden und zusätzlich 9 cm von einem Ende entfernt, 3 PVC-Kämme in der Halterung der Agaroseträger 1 mm über dem Boden befestigt. Dadurch bilden sich nach der Polymerisierung des Gels und Entfernung der Kämme etwa 6 x 10 x 1 mm große Taschen im Gel, in die bis zu 30 µl DNA-Lösung pipettiert werden können. Agarosegele können in Frischhaltefolie mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

3.2.7. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

3.2.7.1. TENS-Methode für Mini-Plasmid-Prep

Die Isolierung von Plasmid-DNA nach der TENS-Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Zellen. Zunächst wurden die entsprechenden Bakterienkulturen zentrifugiert, das Pellet in 50 µl P1-Puffer resuspendiert und in 300 µl TENS-Puffer aufgenommen. Dabei wird durch die Komponenten NaOH, dem Detergenz SDS und Tris-Base die Lyse vorangetrieben. Danach wurden 150 µl Na-Acetat (pH 5,2) zugegeben, wodurch genomische DNA und andere Zellbestandteile präzipitiert werden. Die im Verhältnis zu den anderen Bestandteilen relativ niedermolekularen Plasmide und Salze bleiben in Lösung und wurden nach Abzentrifugation der übrigen Zellbestandteile mit 1 ml eiskaltem Ethanol (95%) gefällt und erneut pelletiert. Danach wird mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, wobei die ausgefällten Salze entfernt, und die DNA in destilliertem H₂O resuspendiert wurden. Vorteile dieser Methode sind, dass man den Puffer schnell und billig selbst herstellen und sie in kurzer Zeit durchführen kann. Nachteilig ist jedoch, dass die so gewonnene Plasmid-DNA relativ unrein ist und das Verfahren daher nur zu analytischen Zwecken genutzt werden kann.

3.2.7.2. Midi-Plasmid-Prep Methode (Quiagen)

Zunächst wurde eine bestimmte Menge LB-Medium mit einer das gewünschte Plasmid enthaltenden Bakterienkultur angeimpft und für 8 h bei 37°C unter heftigem Schütteln inkubiert. Dem LB-Medium kann vorher ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt werden. Die Lösung wurde nun bei 4°C für 20 min zentrifugiert (4000 rpm). Das Bakterienpellet wurde zunächst in 4 ml Puffer P1 resuspendiert und dann mit 4ml Puffer P2 vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden weitere 4 ml P3 Puffer zugegeben, heftig geschüttelt und die Lösung für 15 min auf Eis gestellt. Um das Plasmid erstmals von Zellbestandteilen zu trennen, wurde die Lösung zentrifugiert (4000 rpm bei 4°C für 30 min) und wieder auf Eis gestellt. Nun wurden bestimmte, vom Hersteller mitgelieferte Säulensysteme verwendet, die mit dem Durchlauf von 4 ml QBT-Puffer vorbereitet wurden. Danach

wurde die Probe aus der Zentrifuge über einen Papierfilter in die Säule laufen gelassen, wobei die Plasmid-DNA in einer Glasfibermatrix in der Säule gebunden wurde. Nachdem 2mal mit jeweils 10 ml QC-Puffer gewaschen wurde, wurde die Säule auf ein neues Röhrchen gestellt. Unter Zugabe von 5 ml QF-Puffer wurde die DNA aus der Säule eluiert. Zur Probe wurden 3,5 ml Isopropanol gegeben, um sie danach noch einmal für 30 min bei 4°C und 13000 rpm zu zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen und noch mal für 5 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde restlos mit der Pipette aufgenommen und das gewaschene Plasmid-Pellet in 100 µl H₂O resuspendiert. Die Konzentration konnte nun mittels photometrischer Messung bestimmt werden (Kapitel 2.17.). Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.7.3. Micro-Plasmid-Prep Methode (Amersham)

Bei Bedarf an hoch reinen DNA-Proben wurde dieses Kit verwendet. Das Aufbrechen der Zellen bewerkstelligt hier Lösung 1 durch eine modifizierte alkalische Lyse. Diese Methode eignet sich zur Isolation von Plasmiden aus 1,5 – 2 ml Zellkulturen. Die DNA wird in eine bestimmte Säule gegeben und an eine Glasfibermatrix in dieser Säule gebunden. Über mehrere Waschschrte werden Proteine und andere Verunreinigungen entfernt und die DNA schließlich mit Wasser wieder eluiert. Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.8. Isolation von Plasmid-DNA aus Hefen (Modifizierte TENS-Methode)

Da Hefen eine robuste Zellwand aus Chitin, sowie eine ausgeprägte Glycokalix besitzen, reicht eine einfache alkalische Lyse, wie sie bei Bakterien verwendet wird, nicht aus. Deshalb werden die Hefezellen mit etwa dem gleichen Volumen an Glasbeads (Sigma, Ø 425 – 600 µm) unter ca. 15 min Vortexen aufgebrochen. Die restlichen Isolierungsschritte sind identisch mit der TENS-Methode (Kapitel 3.2.7.1.).

3.2.9. Isolation von DNA aus Agarosegelen (GFX Gel Band Purification Kit, Amersham)

Bei dieser Methode kann DNA aus Agarosegelen wiedergewonnen werden. Dazu werden die Gelstücke mit der DNA in Capture-Puffer bei 65°C aufgeschmolzen und die Lösung anschließend über eine Säule mit Glasfibernmatrix gegeben. Der Puffer begünstigt die Bindung der DNA an die Matrix und entfernt ebenso Proteine und Verunreinigungen. Nach Reinigung der DNA mit Waschpuffer, wird diese mit H₂O aus der Säule eluiert. Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers vollzogen.

3.2.10. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki et al., 1988)

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) ermöglicht die gezielte in vitro - Amplifikation von DNA-Fragmenten bis zu einer maximalen Größe von 12 kb. Die Vervielfältigung doppelsträngiger DNA verläuft exponentiell. Zu Beginn der Reaktion muss die doppelsträngige DNA-Matrize durch kurzzeitiges Erhitzen auf über 90°C in Einzelstränge denaturiert werden. Im anschließenden Anlagerungsschritt binden spezifische Oligonukleotide, die so genannten Primer, an ihre komplementären Sequenzen auf der „Template-DNA“. Die für diesen „Annealing-Schritt“ eingesetzte Temperatur ist von der Basenzusammensetzung und der Größe der verwendeten Primer abhängig. Es werden jeweils zwei spezifische Primer benötigt, die das zu amplifizierende Fragment eingrenzen und zu je einem der Matrizenstränge komplementär sind. Wenn die beiden Primer gebunden haben, werden die beiden freien 3'-Enden durch die Polymerase komplementär zu dem jeweiligen Matrizenstrang synthetisiert. Diese Elongation wird bei einer für die eingesetzte Polymerase optimalen Arbeitstemperatur durchgeführt. Alle für diese Technik verwendbaren Polymerasen stammen aus thermophilen Mikroorganismen und arbeiten bei Temperaturen zwischen 68°C und 72°C. Nach dem Elongationschritt beginnt ein neuer Zyklus, der ebenfalls wieder aus Denaturierung, Annealing und Elongation besteht. Die genauen Zyklusbedingungen, mit denen DNA-Amplifikationen durchgeführt werden, sind im Folgenden aufgelistet:

3 min	94°C	Denaturierung	
50 s	94°C	Denaturierung	} x 30 Zyklen
50 s	58°C	Annealing	
3 min	72°C	Elongation	
10 min	72°C	Elongation	

Das beschriebene Programm wurde im Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt. Die PCR wurde nach dem ProofStart PCR Protokol von Quiagen mit dem folgenden Pipettierschema durchgeführt.

Tab. 3: Pipettierschema nach dem ProofStart PCR Protokol von Quiagen.

Komponenten	Volumina	Konzentrationen der Ausgangslösungen
dNTP-Mix	1,5 µl	10 mM von jeder
ProofStart PCR Puffer	5 µl	10 x
Primer A	Variabel	1 µM
Primer B	Variabel	1 µM
ProofStart DNA Polymerase	1 µl	2,5 units
DNA Template	Variabel	≤ 1 µg/Reaktion

Die Ansätze wurden mit sterilem H₂O_{dest} auf 50 µl Endvolumen aufgefüllt. Nach der PCR wurden die Ansätze in einem Agarosegel analysiert.

3.2.11. Error Prone PCR (Driscoll P.C., 2002)

Das Prinzip der Mutagenisierung von DNA beruht genau wie jede PCR auf einer DNA-Polymerisierungsreaktion. In Anlehnung an eine PCR unter Optimalbedingungen wurden einige Parameter variiert, um so eine möglichst hohe Mutagenisierungsrate zu erhalten. Es wurde zum Beispiel die Taq-Polymerase („non-proofreading polymerase“) von Biolabs verwendet. Um eine verminderte Genauigkeit der Aneinanderlagerung der beiden DNA-Stränge zu erzielen, wurden geringe Annealing-Temperaturen gewählt. Des weiteren wurden niedrige oder ungleiche Mengen an dNTP's eingesetzt und hohe Konzentrationen an Mg^{2+} (mehr als 10 mM) und Mn^{2+} (bis zu 5 mM) zugegeben. Zur Durchführung der Error Prone PCR wurden die Primer 5`HLA-A2mut rekomb. und 3`HLA-A2mut rekomb. und als Template der Vektor pYD3 HLA A2 β 2-MG verwendet.

Tab. 4: Pipettiertschema der Error Prone PCR

Komponenten	Ausgangslösungen
1,5 μ l dNTP	10 mM, jede
0,5 μ l $MnCl_2$	100 mM
0,5 μ l 3`Primer	100 μ M
0,5 μ l 5`Primer	100 μ M
1,5 μ l $MgSO_4$	100 mM
15 μ l 10x Reaktionspuffer	2 mM
1,5 μ l Taq-Polymerase	5 U/ μ l
128 μ l H_2O_{dest}	
1 μ l Template	100 ng/ μ l

Um die Mutagenisierungsrate weiter zu steigern, wurde die Anzahl der PCR-Zyklen erhöht und nach folgendem Schema durchgeführt:

2 min	95°C	Denaturierung	} x 50 Zyklen
30 s	95°C	Denaturierung	
30 s	50°C	Annealing	
90 s	72°C	Elongation	

Danach wurde das PCR-Gerät auf 4°C ohne Zeitbegrenzung eingestellt.

Nach der PCR wurden die Ansätze in einem Agarosegel analysiert, ausgeschnitten und mit dem GFX Gel Band Purification Kit aufgereinigt. Danach wurde erneut eine PCR unter den gleichen Bedingungen mit der gereinigten GFX-DNA (jedoch mit 4 µl Template) durchgeführt.

3.2.12. Sequenzierung von DNA-Fragmenten (Sanger et al., 1977)

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach einer modifizierten PCR-Methode mit Hilfe eines Thermo-Cyclers und einem LI-COR, einem automatisierten DNA-Sequenzierers. Für eine Sequenzierung müssen 4 Ansätze mit einem fluoreszenzmarkierten Primer und je einem ddNTP (Didesoxynukleotidphosphat) neben den üblichen Komponenten einer PCR eingesetzt werden. Der gewählte Primer muss etwa 50 bp vor dem zu sequenzierenden Bereich liegen. Das Prinzip der Methode beruht auf dem willkürlichen Einbau eines Didesoxynukleotides anstatt eines Desoxynukleotides, was zu einem Kettenabbruch am 3'-Ende des DNA-Fragments führt. Wurden neben den regulären Bausteinen, Didesoxyadeninmoleküle zugegeben, bricht die Synthese in diesem Ansatz nach dem Einbau eines Adenins ab. Da diese ddNTPs aber nur zu wenigen Prozent vorliegen, bricht statistisch jedes Fragment nach einem Adenin an einer anderen DNA-Position ab. Dies führt zu unterschiedlich langen Fragmenten mit einem konstanten 5'-Ende und variablen 3'-Enden. Die 4 Ansätze werden nach der Sequenzier-PCR in 4 nebeneinander liegenden Taschen eines Sequenziergels aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Reihenfolge der in Gellaufriktion detektierten fluoreszierenden Signale in den 4 Didesoxynukleotidspuren gibt die Basenfolge im DNA-Fragment wieder. Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des SequiTherm EXCEL™II Kits der Firma EPICENTRE® durchgeführt. Der in diesem Kit neben der Polymerase

enthaltene Puffer stellt die für die Polymerase notwendigen Cofaktoren und die pH - Bedingungen bereit und enthält ausserdem die dNTPs. Zusammen mit den fragmentspezifischen fluoreszenzmarkierten Primern und der Template-DNA wurden von diesen Komponenten der so genannte „Premix“ hergestellt. Dieser wurde auf 4 Ansätze aufgeteilt und die im Kit enthaltenen 4 ddNTPs jeweils zu einem Ansatz dazugegeben. Anschließend wurde folgendes Sequenzier-PCR-Programm (nach dem Squi Therm EXCEL™II Protokoll) in einem Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt:

5 min	95°C		
30 s	95°C	}	x 30 Zyklen
30 s	50°C		
1 min	70°C		

Nach der PCR wurde jeder Ansatz mit dem im Kit enthaltenen Stop/Loading Puffer versetzt und bei 4°C bis zur Sequenzierung aufbewahrt.

3.2.13. Herstellung eines DNA-Sequenzgels

DNA-Fragmente aufzutrennen, die sich nur in ihrer Länge um eine Base unterscheiden, wurde erst durch das verbesserte Auflösungsvermögen der Gelelektrophorese möglich. Bei der Gelelektrophorese müssen solche DNA – Fragmente gut voneinander getrennt werden, um Rückschlüsse auf die Basenabfolge innerhalb des DNA–Stranges ziehen zu können. Daher wurde als Sequenzierungsgel ein 6% Polyacrylamidgel gewählt. Hier wird die Gelmatrix durch Copolymerisation von Acrylamid und quervernetztem Bisacrylamid gebildet. Porengröße und Auftrennungseigenschaften werden von der Acrylamid– und Bisacrylamidkonzentration bestimmt. Dimethylsulfoxid (DMSO) startet die Polymerisierungsreaktion, wohingegen der freie Radikalbildner Ammoniumpersulfat (10% APS – Lösung) als Katalysator wirkt. Da bei den durchgeführten Sequenzierungen mit Hilfe eines Infrarot–Lasers die Basenfolge bestimmt wird, müssen die Glasplatten, zwischen denen das Gel liegt, absolut sauber sein.

Ansonsten könnten die Sequenzdaten verfälscht und der Gellauf beeinträchtigt werden. Schmutz und Staub wurden mit destilliertem Wasser weggespült, danach die Glasplatten mit 80% Isopropanol nachbehandelt. Auf zwei Seiten wurden 0,25 mm Spacer gelegt und die Glasplatten zusammengeklammert. Die vorbereitete Gellösung konnte dann zwischen die Glasplatten gegossen werden. Zwischen die Aussparung der oberen Platte wurde vor der Polymerisation in horizontaler Lage der Vorkamm eingeführt, der nach der Polymerisation wieder entfernt wurde. Die äußeren Seiten der Glasplatten wurden nach der Polymerisation erneut gereinigt. Anschließend konnten die Glasplatten mit dem Gel senkrecht in den Sequenzierautomat eingespannt und die Pufferreservoirs mit 1 x TBE-Puffer gefüllt werden. Nach dem Entfernen vorhandener Luftblasen aus den Gel-Puffer-Anschlußstellen wurde der Gelvorlauf gestartet. Danach wurde der eigentliche Kamm, der die einzelnen Sequenzieransätze voneinander trennt, eingesetzt und das Gel mit den DNA-Proben beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei ca. 1500 V und dauert je nach Länge der zu analysierenden DNA-Fragmenten 8–14 h, wobei alle gesammelten Daten im Computer gespeichert wurden. Die Datenerfassung erfolgt mit dem Programm LI-COR™ BASE IMAGIR® Data Collection Vers. 02.31.

3.2.14. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Maniatis et al., 1989)

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme prokaryontischer Organismen, die dazu dienen, das eigene Genom vor der Integration fremder DNA zu schützen, indem sie die fremden Moleküle durch Zerschneiden ihrer Phosphodiesterbindungen zerstören. Die Erkennung von artfremder und eigener DNA erfolgt aufgrund unterschiedlicher Methylierungsmuster. Die Nomenklatur der Restriktionsendonukleasen bezieht sich auf die Organismen, aus denen sie isoliert worden sind. Hierbei geben die ersten 3 Buchstaben Gattung und Art an und ein eventuell vorhandener 4. Buchstabe den Serotyp der Spezies. Die römische Ziffer bezieht sich auf die aus dieser Spezies bereits isolierten Enzyme.

Ein Restriktionsverdau wurde durchgeführt, indem 0,5 µg DNA in analytischen Ansätzen bzw. bis zu 10 µg zu präparativen Zwecken in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl 10fach Restriktionspuffer von 2 bis 5 Units¹ Enzym pro µg DNA geschnitten wurden.

Bei Doppelverdauen wurde die doppelte Pufferkonzentration gewählt, um unspezifisches Schneiden der Enzyme (Sternaktivität) zu vermeiden. Alle Ansätze wurden nach den Angaben und mit den Materialien des Herstellers durchgeführt.

¹ Unter einem Unit (U) Enzym versteht man die Menge Enzym, die notwendig ist, um 1 µg DNA bei 37°C vollständig zu verdauen.

3.2.15. Ligation von DNA-Fragmenten (Sgaramella et al. 1970)

Während einer Ligation wird die Verknüpfung zueinander passender DNA-Fragmente von dem Enzym Ligase katalysiert. Es wurde die T4-Ligase aus dem T4-Bakteriophagen verwendet. Die Ligierung der beiden DNA-Fragmente erfolgt über Phosphordiesterbindungen und ist ATP-abhängig. Für die Reaktion wurden äquimolare Mengen an Vektor und dem zu inserierenden DNA-Fragment bei 4°C mindestens über Nacht mit 100 U Enzym in Ligase-Puffer inkubiert. Mit der Hälfte eines solchen Ligationsansatzes wurden Bakterien transformiert.

3.2.16. Klonierung mit dem Zero Blunt® Topo® PCR Cloning Kit (Invitrogen)

Der Reaktionsansatz zur Klonierung in PCR® BluntII-TOPO® wurde gemäß der Angaben des Herstellers zusammengestellt. Dazu wurden 0,5 bis 4 µl frisches PCR-Produkt mit 1 µl Salzlösung (im Kit enthalten), sterilem H₂O add 5 µl und 1 µl TOPO®-Vektor zusammen gegeben. Einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine komplette Transformation des Ansatzes in DH5α-Bakterien.

3.2.17. Photometrische Messung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird mittels photometrischer Messung bestimmt. Das Prinzip eines Photometers beruht auf der Messung der Lichtabsorption durch eine, sich im Strahlengang befindliche Substanz bei einer konstanten Wellenlänge. Nukleinsäuren besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm. Nach dem Lambert – Beerschen – Gesetz kann die Extinktion bei $\lambda = 260$ nm in

die DNA – Konzentration umgerechnet werden. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm Wellenlänge und eine Küvettendicke von 1 cm, entsprechen einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (bzw. 40 µl/ml einzelsträngiger Nukleinsäure oder 33 µg/ml Oligonukleotide). Da die Absorption nur in einem definierten Bereich proportional zur Konzentration ist, sollte eine Absorption von 2,0 bei einer Messung nicht überschritten werden. Zusätzlich zur Konzentrationsbestimmung kann die Reinheit einer DNA – Lösung am Photometer bestimmt werden. Hierzu wird der Quotient aus OD 260 nm und OD 280 nm berechnet. Der Quotient reiner DNA sollte zwischen 1,65 und 1,85 liegen. Höhere Werte lassen auf phenolische Rückstände in der Probe schließen, niedrigere lassen eine Verunreinigung durch Proteine vermuten.

3.2.18. Messung der optischen Dichte von Zellkulturen

Die Bestimmung der optischen Dichte von Zellkulturen erfolgt in der Regel bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die am Detektor ankommende Lichtintensität ist kein Resultat der molekularen Absorption, wie es das Lambert – Beersche – Gesetz beschreibt, sondern besteht aus Streulicht. Die Lichtmenge wird von der Geräteoptik beeinflusst. Die optische Dichte verhält sich nur bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 linear. Eine Faustregel besagt, dass für E.Coli bei einer OD₆₀₀ von 1×10^8 Zellen/ml enthalten sind.

3.2.19. Immunfluoreszenzfärbung von Hefen

Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden induzierte Hefen in 96–well Platten zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde jeweils 30 µl eines Primärantikörpers zugegeben. Als solche wurden je nach Fragestellung HLA–ABC Monoclonal Mouse Anti-Human Antigen (Verdünnung 1:100), Rabbit Anti–Human Beta–2– Mikroglobulin (Verdünnung 1:500), ein BB7.2–Antikörper (Verdünnung 1:100) und Anti–His (Verdünnung 1:500) eingesetzt. Die Inkubationszeit bei gelegentlichem Rütteln betrug 45 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von einem Waschschriff mit PBS. Als Sekundärantikörper dienten in einer Verdünnung von 1:200 ein Biotin– gekoppelter

Anti-Mouse Antikörper und ein Biotin-gekoppelter Anti-Rabbit Antikörper, die je nach Primärantikörper in einer Menge von 30 µl verwendet wurden. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug 30 Minuten. Nach erneutem Waschen mit PBS und Zugabe von 30 µl Streptavidin – gekoppeltes R-Phycoerythrin (PE; Verdünnung 1:200), welches 4 Bindungsstellen für Biotin besitzt, wurden die so behandelten Hefen nach 15 Minuten mit 180 µl PBS abgelöscht und durchflusszytometrisch mit dem FACScan (Becton Dickinson™) untersucht. Für die Analyse der gewonnenen Daten wurde das Programme WinMDI®, Version 2.8 verwendet.

3.2.20. Zellsorting (Melamed, Lindmo, Mendelsohn, 1990)

Die Durchflußzytometrie hat sich als perfekte Methode bewährt, Zellen eines bestimmten Types aus einem Gemisch unterschiedlicher Zelltypen zu isolieren, wenn einfache Trennverfahren wie Filtration oder Zentrifugation nicht angewendet werden können. Zu diesem Zweck müssen die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden. Dazu werden Primärantikörper benutzt, die spezifisch an Oberflächenproteine der gewünschten Zellen binden (3.2.19.). Nach der erfolgten Fluoreszenzmarkierung der Zellen kann die Zellmischung mit Hilfe eines Zell-Sorters aufgetrennt werden. Dieses Gerät kann Zellen identifizieren, die ein Fluorochrom tragen, und kann diese von den anderen Zellen des Gemisches trennen. Dazu wird eine Zellsuspension in einzelne Tröpfchen zerlegt, wobei Tropfengröße und Zelldichte so eingestellt werden, dass sich nicht mehr als eine Zelle in einem Tropfen befindet. Ein Ultraschallgenerator sorgt für die richtige Tropfengröße am Ausgang einer Düse, die mehrere 1000 Tropfen pro Sekunde durch lässt. Bevor die Suspension die Düse erreicht, wird der Fluoreszenztest gemacht: Anregungslicht aus einem Laser wird in die Suspension geleitet und die Fluoreszenzemission gemessen. Wenn eine fluorochromhaltige Zelle das Messfenster passiert, gelangt ein Fluoreszenzsignal zu den Lichtdetektoren (Photomultiplier tubes, PMT) und der Tropfen, der die fluoreszierende Zelle enthält, erhält eine elektrische Ladung (Abb. 3.3.). Der elektrisch geladene Tropfen mit der fluoreszenzmarkierten Zelle wird dann von einem starken elektrischen Feld abgelenkt und aus der senkrechten Bahn gebracht: Zwei Ablenkplatten sorgen für die Trennung von geladenen und

ungeladenen Tröpfchen. Die fluoreszenzmarkierten Zellen werden so in die seitlichen Auffanggefäße sortiert, während die unmarkierten in das mittlere Gerät gelangen.

Die Zellen der Suspension schwimmen in einer elektrisch leitenden Salzlösung, die durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgeladen werden kann. Dazu werden zwei Elektroden gebraucht: Die eine ist mit der Düse oder deren Zuführung verbunden, die andere mit einer Metallhülse, die die Düse umgibt aber nicht berührt. Wenn die Fluoreszenzmessung eine markierte Zelle registriert, aktiviert das PMT-Signal eine Spannungsquelle (V-control), die eine Spannung von etwa 100 V auf die beiden Elektroden gibt.

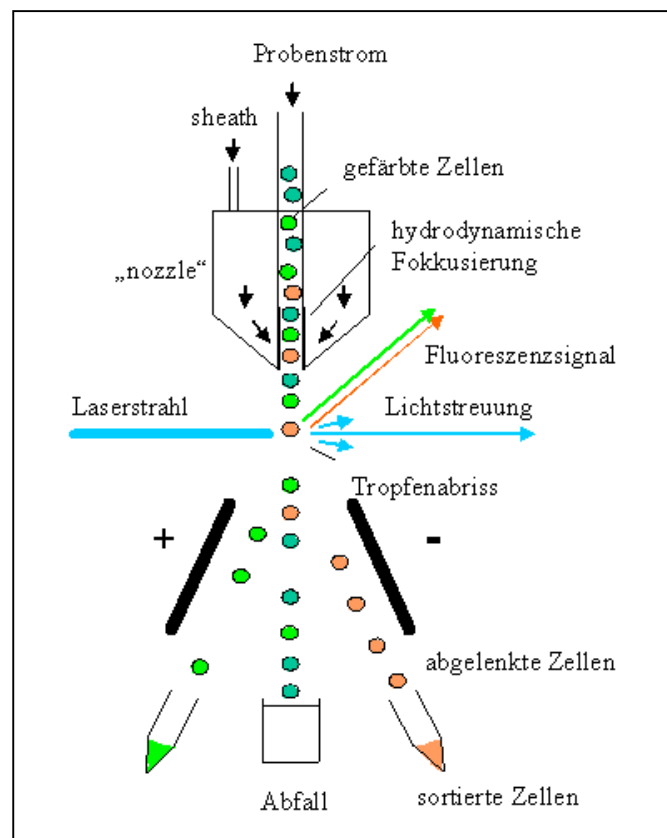


Abb. 3.3.: Schematische Darstellung des Zellsorting. Durch die gefärbte Zellsuspension wird aus einem Laser Anregungslicht geleitet und die Abstrahlung von Fluoreszenzlicht gemessen. Tropfen mit gefärbten, fluorochromhaltigen Zellen erhalten beim Austreten aus der Düse eine elektrische Ladung. Die elektrisch geladenen Tropfen werden nun aus dem Zellstrom heraus in eine Richtung abgelenkt und können in einem Auffanggefäß gesammelt werden.

Diese Spannung erzeugt ein elektrostatisches Feld und somit eine Ladung an der Oberfläche der Flüssigkeitssäule in der Düsenzuführung. Die Ladung verbleibt auch nach Ablösen von der Flüssigkeitssäule auf den Tropfen. Das Gerät ist so konzipiert, dass die Spannung immer nur in dem Moment angelegt wird, wenn sich ein Tropfen mit einer markierten Zelle (orange) aus der Düse löst, so dass nur Tropfen mit markierten Zellen elektrisch geladen werden. Markierte Zellen wandern in geladenen Tropfen, unmarkierte Zellen in ungeladenen Tropfen durch das Gerät, so dass nur gefärbte Zellen im elektrischen Feld zwischen den Ablenkplatten eine Änderung der Fallrichtung erfahren.

Die Messungen, sowie die Zellseparation wurden an einem Zell-Sorter der Firma Dako-Cytomation (Moflo) durchgeführt. Die Anregung der Phycoerythrin gefärbten Zellen erfolgte mit einem Laser der Firma Cohrent, Innova 70C bei einer Wellenlänge von 488 nm, die Analyse bei 570 nm mit einer Filterpassbreite von 40 nm.

3.2.21. Mac-Sorting (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach)

Die MACS– (Magnetic Associated Cell Sorting) Separation schließt sich an eine immunfluoreszenztechnische Färbung mit R-Phycoerythrin an (Kapitel 2.19.). Anschließend werden die Zellen mit magnetisch geladenen Anti-PE MicroBeads behandelt. Dann wird die Zellsuspension auf eine spezielle Säule geladen und in einer Halterung im magnetischen Feld des MACS-Separators platziert (Abb. 3.4.). Ein Vorteil bei diesem Verfahren ist die gleichzeitige Elimination von Klonen, die unspezifisch auf den Sekundärantikörper reagieren.

Der Durchfluss wurde zur Steigerung der Effektivität zweimal über die Säule gegeben. Durchlauf und ein Teil des ersten Durchflusses wurden zur Kontrolle des MACS-Erfolges erneut mit den Normalseren behandelt und durchflusszytometrisch gemessen. Bei diesem Versuchsablauf wurden nach Angaben des Herstellers etwa 2×10^8 Zellen und eine dafür vorgesehene MS-Säule verwendet. Die Behandlung der R-Phycoerythrin gelabelten Hefen mit Anti-PE MicroBeads sowie alle anderen Schritte erfolgten nach der Anleitung des Herstellers.

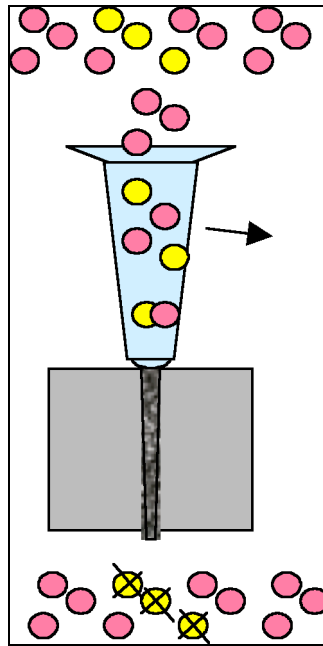


Abb. 3.4.: MS (Multi Select)-Selektionssäule zur Anreicherung magnetisch gelabelter Zellen. Die nicht magnetisch markierten Zellen (gelb) fließen durch die Magnetsäule und können verworfen werden; die Zellen von Interesse (rosa) können anschließend aus der Säule eluiert werden.

4. Ergebnisse

4.1. Konstruktion des Hefeoberflächenexpressionsvektors pYD2

Der ursprüngliche pYD1-Vektor (Invitrogen) wurde konzipiert, um Proteine zu exprimieren, zu sezernieren und auf die extrazelluläre Matrix zu translozieren. Dabei wird auf das AGA 2-Protein zurückgegriffen, welches eine Disulfidverbindung mit dem AGA 1-Protein der Hefezelle *Sacharomyces cerevisiae* eingeht und somit eine Hefeoberflächenexpression ermöglicht (siehe Einleitung). Um die Oberflächenexpression der HLA A2-Moleküle zu steigern, wurde von uns in Anlehnung an Brophy et al. (2003) der pYD1-Vektor modifiziert und ein neuer pYD2-Vektor konstruiert. Der wesentliche Unterschied zum pYD1-Vektor liegt in der Lage des AGA 2-Gens, welches im neuen pYD2-Vektor an das C-terminale Ende im Anschluss an c-myc kloniert wurde. Ferner wurde ein 8x His-Tag zur Detektion angehängt.

Aga2 signal peptide									
ATG CAG TTA CTT GCT GTT TTT AAT ATT TnT GTt ATT GcT AGc GTT <u>TTA GCA</u>									
Start Aga 2									
1	2	3	HindIII		PstI		1. Linker Glycin-Serin		
CAG	GAA	CTG	AAG	CTT	CTG	CAG	GCT	AGT	GGG
GGA	GGT	GGC	TCT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
GGT TCT GGA GGT GGC GGG TCT GAA TTC CAC CCA AGC AGT GGT ATC AAC GCA									
GGT TCT GGA GGT GGC GGG TCT GAA TTC CAC CCA AGC AGT GGT ATC AAC GCA									
GAG TGG CCA TTA TGG CCC GGG AAA AAA CAT GTC GGC CGC CTC GGC CTC GGT									
AGG GTG GGC ATC GAT ACG AGA TCC ATC GAG CTC GAG GGt GGA ATA GGT TCT									
GGT GGA GGT GGA TCT Gga GGG GGT GGA TCC <u>GAG CAA AAC CTC ATT TCT GAA</u>									
<u>GAC TTG</u>									
Start Aga2									
CAG	GAA	CTG	ACA	ACT	ATA	TGC	GAG	CAA	ATC
CCC	TCA	CCA	ACT	TTA	GAA	TCG	ACG	CCG	TAC
TCT	TTG	TCA	ACG	ACT	ACT	ATT	TTG	GCC	AAC
GGG	AAG	GCA	ATG	CAA	GGA	GTT	TTT	GAA	TAT
TAC	AAA	TCA	GTA	ACG	TTT	GTC	AGT	AAT	TGC
GGT	TCT	CAC	CCC	TCA	ACG	Rct	AGC	AAA	GGC
AGC	CCC	ATA	AAC	ACA	CAG	TAT	GGT	TTT	TTT
CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT <u>TGA</u> GTT TAA ACC CGC <u>TGA</u> TCT gAT ACC aAC									
AGT GTA GaT GTA ACA AAA TCG ACT									

Abb. 4.1.: Auszug aus der Vektorkarte des modifizierten Hefeoberflächenexpressionsvektors pYD2.

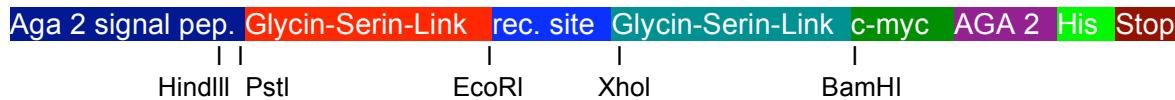


Abb. 4.2.: Schematische Darstellung des exprimierten Anteils des Hefeoberflächenexpressionsvektors pYD2. Erläuterungen siehe Text.

4.2. Klonierung des pYD2- β_2 -Mikroglobulin-HLA A2 Konstruktes

Mit der Absicht das Hefeoberflächenexpressionssystem zur Darstellung eines HLA-Komplexes zu nutzen, wurden die DNA-Sequenzen, welche für die HLA A2 heavy-chain und für β_2 -Mikroglobulin kodieren, als single-chain Konstrukte in den Hefeoberflächenexpressionsvektor pYD2 kloniert. Mage et al. (1992) exprimierten bereits 1992 ein single-chain Konstrukt, bei dem das β_2 -Mikroglobulin über einen Linker mit der heavy-chain verbunden war. Eine neuere Studie konnte belegen, dass single-chain Konstrukte zusammengesetzt aus Peptid-Linker- β_2 -MG-Linker-heavy-chain sehr effizient gebaut werden können, ihre Struktur beibehalten und durch eine hohe Stabilität an der Zelloberfläche überzeugen (Yu et al., 2002).

Für die Klonierung wurde zunächst der pYD2-Vektor durch die beiden Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI verdaut und an der so entstandenen Schnittstelle die ebenfalls entsprechend präparierte HLA A2 heavy-chain mit Hilfe einer Ligase in den Vektor ligiert. Das PCR-Template für die HLA A2 heavy-chain war bereits im Labor vorhanden.

Parallel dazu wurden Negativkontrollen für Vektor und Insert durchgeführt. Zur weiteren Erfolgskontrolle wurde ein EcoRI/XhoI-Kontrollverdau (Abb. 4.3.) der gewachsenen Bakterienkolonien mit Negativkontrolle durchgeführt. Die Richtigkeit der klonierten Plasmide, wurde im Anschluß durch eine Sequenzierung überprüft.

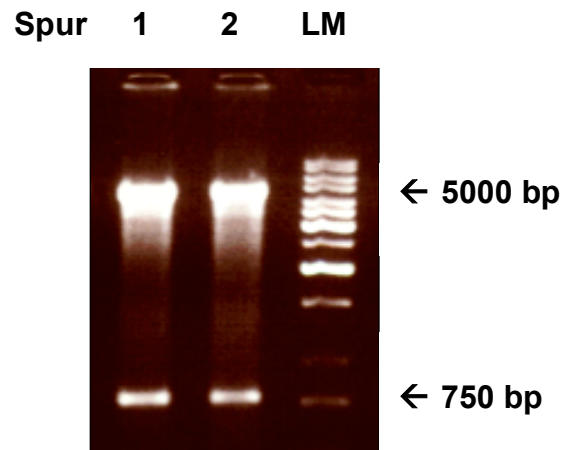


Abb. 4.3.: Agarosegelelektrophorese eines pYD2-HLA A2-Verdau mit den beiden Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI. Auf den Spuren 1 und 2 erkennt man jeweils in der dickeren oberen Bande den pYD2-Vektor und in der dünneren unteren Bande das zur Kontrolle ausgeschnittene HLA A2.

Analog dazu wurde in einem zweiten Schritt ein Vektorverdau mit den Restriktionsendonukleasen NheI und HindIII durchgeführt. Die durch eine PCR hergestellte und entsprechend verdaute β_2 -Mikroglobulin light-chain wurde an der resultierenden Schnittstelle mittels einer Ligation in den pYD2-HLA A2-Vektor eingefügt. Die erfolgreiche Klonierung wurde in einem Kontrollverdau mit Negativkontrolle überprüft (Abb. 4.4.). Eine genaue Bestätigung der korrekten Sequenz erfolgte ebenfalls im Anschluss durch Sequenzierung.

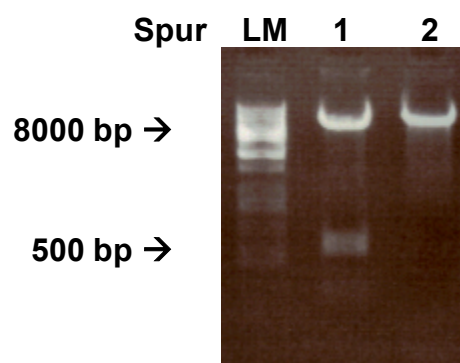


Abb. 4.4.: Agarosegelelektrophorese eines pYD2- β_2 -Mikroglobulin-HLA A2 Kontrollverdaus durch die Restriktionsendonukleasen NheI und HindIII. Die Spur 1 zeigt zwei Banden. Die obere dickere Bande entspricht dem pYD2-HLA A2-Konstrukt und die untere Bande dem ausgeschnittenen β_2 -Mikroglobulin. Spur 2 zeigt als Negativkontrolle einen Verdau eines pYD2-HLA A2 Konstruktes ohne β_2 -Mikroglobulin. Es wurde ein 1 kb DNA-Längenmarker verwendet.

Um das entstandene single-chain Konstrukt an der Hefeoberfläche zu exprimieren, wurde eine Hefetransformation nach Gietz (3.2.5.) durchgeführt. In Abhängigkeit vom Hefewachstum, wurde nach etwa zwei Tagen Induktion eine FACS-Färbung durchgeführt.

4.3. FACS-Analyse des pYD2- β_2 -Mikroglobulin-HLA A2 Konstruktes auf Hefen

Die induzierten Hefen wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung in einem FACScan analysiert (Abb. 4.5.), um so die richtig gefalteten single-chain-Konstrukte zu selektieren und um den Erfolg der Induktion zu überprüfen. Dazu wurden folgende Primärantikörper verwendet: HLA-ABC Monoclonal Mouse Anti-Human Antigen, Rabbit Anti-Human Beta-2-Mikroglobulin, der HLA-A2 spezifische Antikörper BB7.2, ein anti-His-Tag Antikörper. Passend dazu wurden die entsprechenden biotinylierten anti-mouse- oder anti-rabbit-Sekundärantikörper und letztlich Streptavidin-PE eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten die jeweiligen Sekundärantikörper.

Aufgrund der positiven FACS-Analyse der anti-His-Immunfluoreszenzfärbung und der Lage des His-Tag am C-Terminus der single-chain kann davon ausgegangen werden, dass das komplette Konstrukt auf die Hefeoberfläche exprimiert wurde (Abb 1.2.). Zur Erfolgskontrolle der korrekten Faltung des HLA A2 wurden die beiden konformationsabhängigen Antikörper HLA-ABC und BB7.2 verwendet. Da diese jeweils negative Ergebnisse lieferten, muss von einer nicht korrekten Proteinkonformation ausgegangen werden.

Wie schon vielfach beschrieben und dargestellt, exprimiert ein Teil der Hefen kein Protein an ihrer Oberfläche (Cochran et al., 2004; Starwalt et al., 2003; Kieke et al., 1999). Dadurch entstehen in der Histogrammdarstellung positiver Hefen zwei Peaks, einen im negativen und einen im positiven Bereich (Abb. 4.5. **A**). Die negativen Zellpopulationen entsprechen Hefen in einem bestimmten Stadium des Zellzyklus, in dem nur geringe Mengen an Fusionsproteinen exprimiert werden (Starwalt et al., 2003). Der Proteinsekretionsapparat kann der gesteigerten Proteinproduktion nicht Folge leisten. Diese negativen Populationen werden bei allen, auf Hefeoberflächen exprimierten Proteinen beobachtet (Boder et Wittrup, 1997; Kieke et al., 1997).

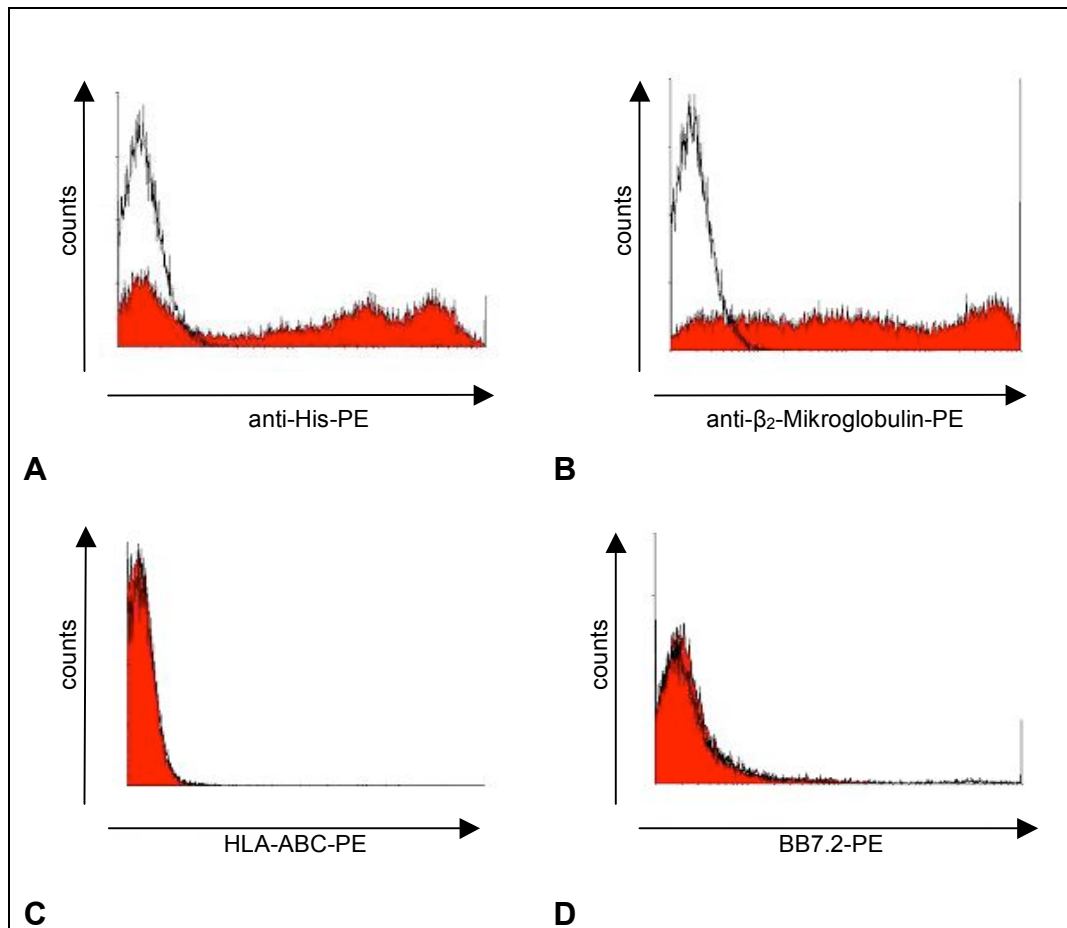


Abb. 4.5.: Histogrammdarstellungen der im FACS analysierten Hefen mit unterschiedlichen Immunfluoreszenzfärbungen zur Darstellung des pYD2-β₂-Mikroglobulin-HLA A2 Konstruktes. **A** Roter Graph: induzierte Hefen mit anti-His-Färbung. Schwarzer Graph: Negativkontrolle. **B** Roter Graph: induzierte Hefen mit anti-β₂-Mikroglobulin-Färbung. Schwarzer Graph: Negativkontrolle. **C** Roter Graph: induzierte Hefen mit HLA-ABC-Färbung. Schwarzer Graph: Negativkontrolle. **D** Roter Graph: induzierte Hefen mit BB7.2-Färbung. Schwarzer Graph: Negativkontrolle. **A** und **B** stellen jeweils positive, **C** und **D** hingegen jeweils negative Ergebnisse dar.

4.4. Klonierung des pYD2-HLA A2-β₂ Mikroglobulin Konstruktes

Mit dem Ziel einer korrekten Konformation der HLA A2-heavy-chain und einer weiteren Steigerung der Hefeoberflächenexpressionsrate, wurde die Reihenfolge der single-chain überarbeitet und umgestellt. Bereits in einer früheren Studie wurden erfolgreich Konstrukte verwendet, bei welchen die heavy-chain kovalent mit dem β₂-Mikroglobulin (heavy-chain-Linker-β₂-MG) verbunden ist (Mottez et al., 1991). In einer jüngeren Studie wurde ein Hefeoberflächenexpressionssystem zur Herstellung

funktioneller muriner Peptid-MHC-Komplexe verwendet und es wurde ebenfalls die heavy-chain vor die β_2 -Mikroglobulin light-chain kloniert (Peptid-Linker-heavy-chain-Linker- β_2 -MG). Es konnte gezeigt werden, dass diese single-chain Form mit und ohne Peptid an der Hefeoberfläche exprimiert werden kann (Brophy et al., 2002). In Anlehnung an diese Erkenntnisse wurde von uns ein neues single-chain Konstrukt mit dem Aufbau heavy-chain-Linker- β_2 -Mikroglobulin kloniert.

Wie unter 4.2. beschrieben, wurde die HLA A2 heavy-chain an den EcoRI- und XhoI-Schnittstellen in den pYD2-Vektor ligiert. Die korrekt erfolgte Klonierung wurde in einem Kontrollverdau mit Negativkontrolle und anschließender Sequenzierung bestätigt. Zur Vorbereitung der weiteren Klonierungsschritte, wurde zunächst eine PCR für die Herstellung der β_2 -Mikroglobulin light-chain durchgeführt. Um die gewünschte Länge und die entsprechenden Schnittstellen zu erhalten, wurden die beiden Primer beta 2 MG 5' Bam und beta 2 MG 3' Bam verwendet. Parallel erfolgte der Verdau des pYD2-HLA A2-Konstruktes mit der Restriktionsendonuklease BamHI. Das β_2 -Mikroglobulin wurde ebenfalls noch mal mit diesem Enzym geschnitten (Abb. 4.6.).

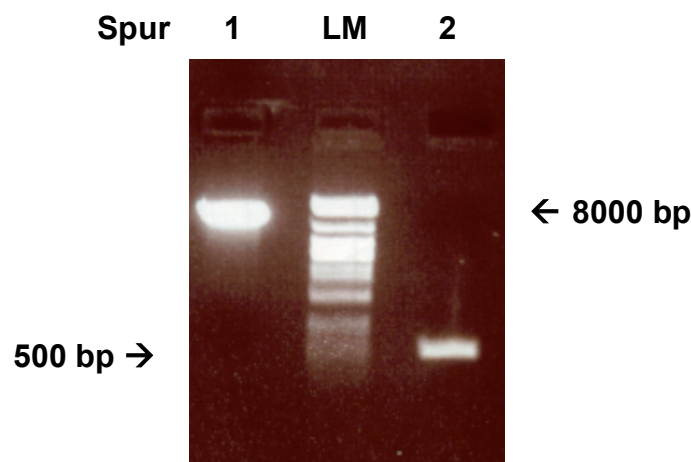


Abb. 4.6.: Agarosegelelektrophorese zur Vorbereitung der Ligation von pYD2-HLA A2 und β_2 -Mikroglobulin. Die Spur 1 zeigt das pYD2-HLA A2 Konstrukt, welches mit der Restriktionsendonuklease BamHI verdaut wurde. Auf der Spur 2 ist das β_2 -Mikroglobulin zu sehen, welches ebenfalls mit BamHI verdaut wurde.

Die beiden Produkte wurden nach der Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und schließlich mit Hilfe einer Ligase ligiert. Auch hier wurden jeweils Kontrollverdau und Negativkontrollen zur Überprüfung des Klonierungserfolges durchgeführt (Abb. 4.7.).

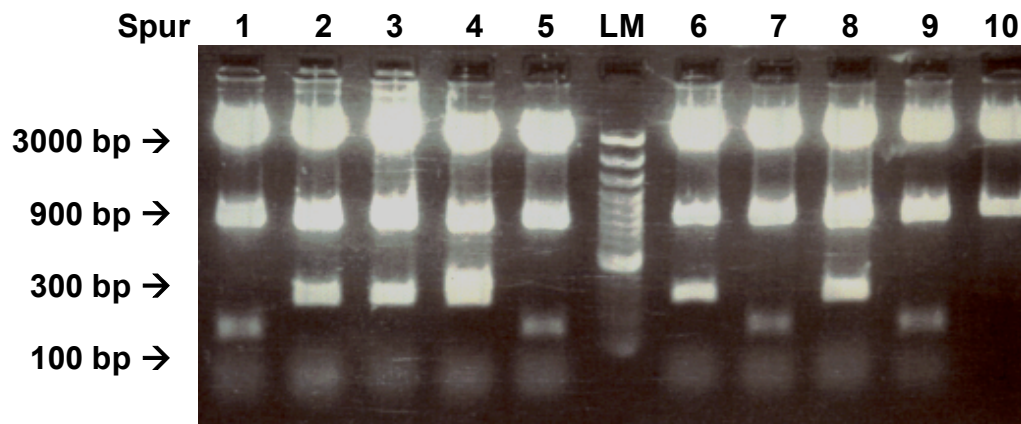


Abb. 4.7.: Agarosegelelektrophorese des Kontrollverdaus. Um herauszufinden, ob das β_2 -Mikroglobulin in der richtigen Orientierung in den Vektor kloniert wurde, wurde das Gesamtkonstrukt mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI verdaut (Spur 1 bis 10). Aufgrund einer EcoRI-Schnittstelle in der β_2 -Mikroglobulin light-chain konnte auf die Sequenzreihenfolge geschlossen werden. Die obere Bande entspricht jeweils dem pYD2-Vektor die folgende zweite Bande dem HLA A2 und die dritte Bande dem Kontrollprodukt. Ausgeschnittene Produkte mit einer Länge von 130 bp deuteten somit auf eine nicht korrekte Ligation (Spur 1,5,7 und 9) und Produkte mit einer Länge von 230 bp auf eine Ligation mit gewünschter Orientierung des Inserts hin (Spur 2,3,4,6 und 8). Spur 10 zeigt als Negativkontrolle einen pYD2-HLA A2 Verdau ohne β_2 -Mikroglobulin. Es wurde ein 100 bp DNA-Längenmarker verwendet. Die Pfeile (→) beziehen sich auf den Längenmarker.

Mit einer abschließenden Sequenzanalyse wurde die Korrektheit der single-chain-Sequenz bewiesen. Im Anschluss wurde ebenfalls die Hefetransformation nach Gietz (3.2.5.) verwendet, um das pYD2-HLA A2- β_2 -Mikroglobulin Konstrukt an der Hefeoberfläche zu exprimieren. In Abhängigkeit vom Hefewachstum wurde nach etwa zwei Tagen Induktion eine FACS-Färbung durchgeführt.

4.5. FACS-Analyse des pYD2-HLA A2- β_2 -Mikroglobulin Konstruktes auf Hefeoberflächen

Zur FACS-Analyse der induzierten Hefen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung wie unter 4.3. beschrieben, durchgeführt. Analog dazu, erfolgten auch die Negativkontrollen. Dadurch sollten die Hefen mit einer korrekt exprimierten HLA A2-Proteinkonformation selektiert werden (Abb. 4.8.).

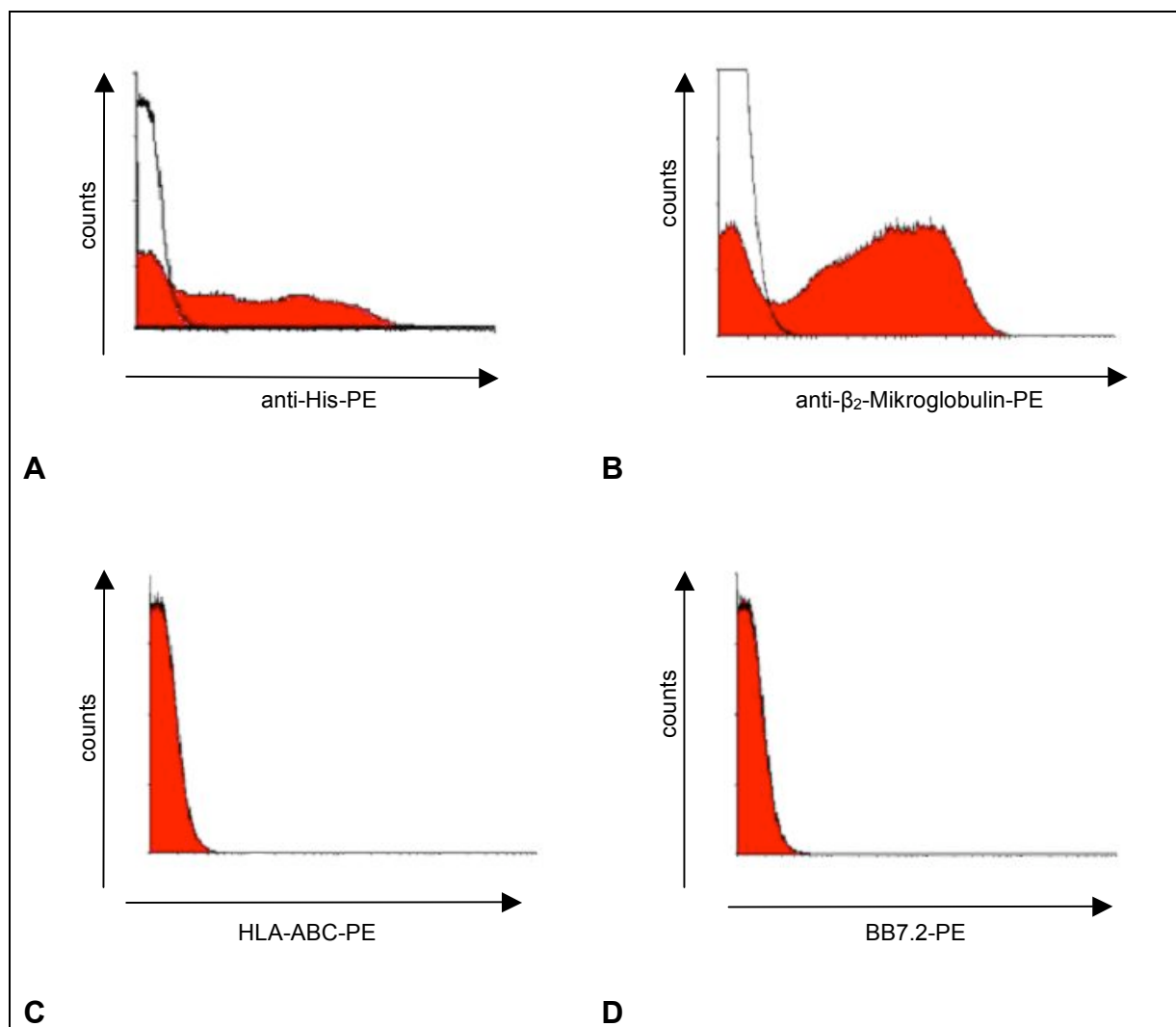


Abb. 4.8.: Histogrammdarstellungen der im FACS analysierten Hefen zur Darstellung des pYD2-HLA A2- β_2 -Mikroglobulin Konstruktes. **A** Roter Graph: induzierte Hefen mit anti-His-Färbung. Schwarzer Graph: Negativkontrolle. **B** Roter Graph: induzierte Hefen mit anti- β_2 -Mikroglobulin-Färbung. Schwarzer Graph: Negativkontrolle. **C** Roter Graph: induzierte Hefen mit HLA-ABC-Färbung. Schwarzer Graph: Negativkontrolle. **D** Roter Graph: induzierte Hefen mit BB7.2-Färbung. Schwarzer Graph: Negativkontrolle. **A** und **B** stellen jeweils positive, **C** und **D** hingegen jeweils negative Ergebnisse dar.

Die erzielten Ergebnisse waren mit denen der FACS-Analyse des pYD2- β_2 -Mikroglobulin-HLA A2 Konstruktes vergleichbar.

Aufgrund der Lage des His-Tag auf der single-chain und den positiven FACS-Ergebnissen der anti-His-Immunfluoreszenzfärbung kann davon ausgegangen werden, dass die komplette single-chain auf die Hefeoberfläche exprimiert wurde. Das positive Ergebnis der anti- β_2 -Mikroglobulin-Färbung spricht für eine korrekte und vollständige Darstellung des β_2 -Mikroglobulin. Wegen der N-terminalen Lage des HLA A2 auf der single-chain kann in Bezug auf die Ergebnisse der anti-His-Färbung und der anti- β_2 -Mikroglobulin-Färbung darauf geschlossen werden, dass die heavy-chain ebenfalls vollständig exprimiert wurde. Zur Kontrolle der korrekten Faltung des HLA A2 wurden wieder die beiden konformationsabhängigen Antikörper HLA-ABC und BB7.2 verwendet. Da diese jeweils negative Ergebnisse lieferten, muss ebenfalls von einer fehlerhaften Proteinkonformation ausgegangen werden.

4.6. Herstellung einer HLA A2-Mutantenbank

In Anlehnung an zwei Studien (Colby et al., 2004; Esteban et Zhao, 2004) wurde von uns eine HLA A2-Mutantenbank entwickelt. Die Überlegung war, durch die Mutationen einen HLA A2 Klon mit richtiger Faltung zu konstruieren und zu finden. Zur effizienten Herstellung dieser Mutantenbank wurde die homologe Rekombination der mutierten PCR-Produkte benutzt. Zur Transformation der DNA in die Hefen wurde die Methode nach Gietz (3.2.5.) verwendet.

Um eine hohe Rekombinationsquote der beiden ähnlichen Glycin-Serin-Linker des pYD2-Vektors als mögliche Fehlerquelle im voraus auszuschließen, wurde von uns der 2. Glycin-Serin-Linker im pYD2-HLA A2- β_2 -Mikroglobulin-Konstrukt durch das Yol-Epitop (Abb. 4.9.) ersetzt. Das Yol-Epitop war im onkologischen Labor bereits vorhanden.

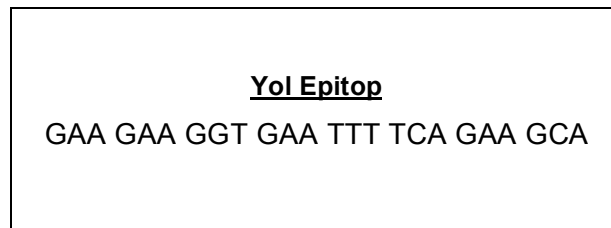


Abb. 4.9.: Der schematische Sequenzausschnitt aus der Vektorkarte des pYD3-Vektors zeigt das Yol Epitop, welches den zweiten Glycin-Serin-Linker ersetzen soll.

Die übrige Vektorsequenz wurde unverändert beibehalten. Der Vektor wurde in pYD3-Vektor umbenannt und das single-chain-Konstrukt somit im Folgenden als pYD3-HLA A2- β_2 -Mikroglobulin bezeichnet. Im weiteren Verlauf, wurde zunächst ein pYD3- β_2 -Mikroglobulin-Konstrukt ohne HLA A2 hergestellt. Dafür wurde das pYD3-HLA A2- β_2 -Mikroglobulin Konstrukt mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XhoI verdaut und somit die HLA A2 heavy-chain und der Glycin-Serin-Linker ausgeschnitten (Abb. 4.10.).

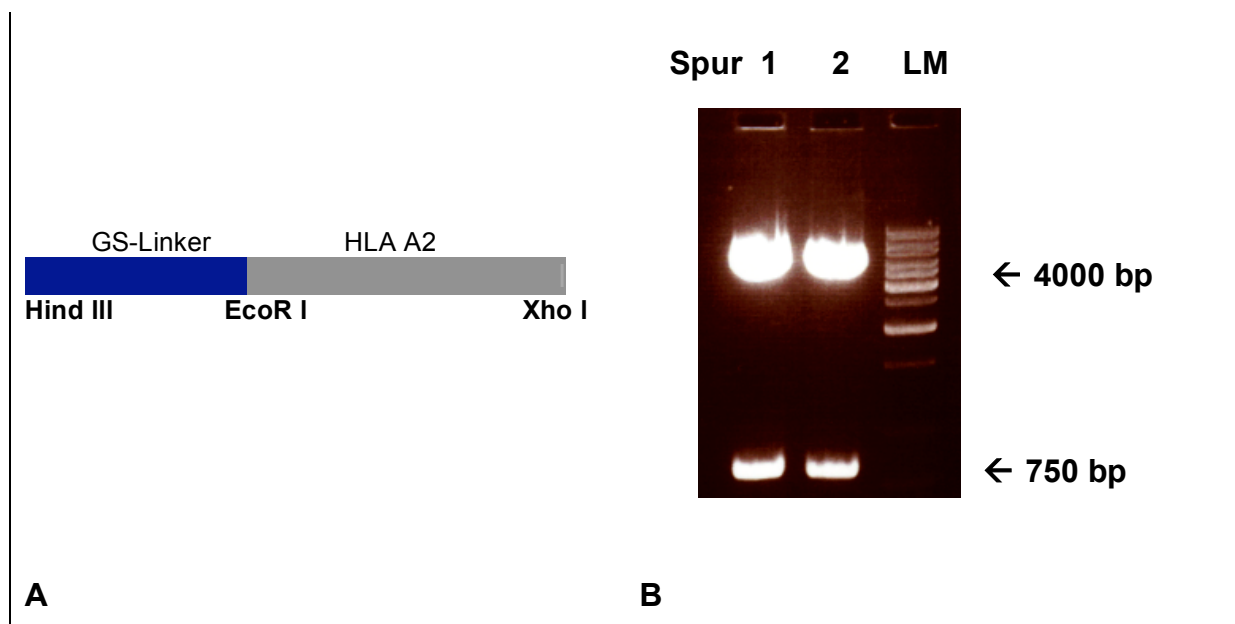


Abb. 4.10.: **A** Schematische Darstellung der DNA-Sequenz, welche durch die beiden Restriktionsendonukleasen HindIII und XhoI aus dem Plasmid (pYD3-HLA A2- β_2 -Mikroglobulin) geschnitten wurde. **B** Agarosegelelektrophorese von HindIII/XhoI verdaulichem pYD3-HLA A2- β_2 -Mikroglobulin (Spur 1 und 2). Der Vektor ist in der dickeren oberen Bande zu erkennen und die dünnere untere Bande entspricht dem ausgeschnittenen Insert (vgl. **A**). Es wurde ein 1 kb Längenmarker verwendet. GS = Glycin-Serin.

Der Glycin-Serin-Linker wurde mitausgeschnitten, weil bei einem EcoR1-Verdau des gesamten Vektors auch β_2 -Mikroglobulin wegen der erhaltenen Schnittstelle geschnitten worden wäre. Das entstandene Insert wurde nochmals mit der Restriktionsendonuklease EcoRI verdaut, um den Linker abzuschneiden. Anschließend wurde das Produkt als Template für die spätere Error Prone PCR zur Herstellung der HLA A2-Mutanten verwendet.

Mit Hilfe einer PCR wurde ein neues Insert hergestellt. Dafür wurden die beiden Primer 5' pYD3 Eco/Xho rek. und 3' pYD3 Eco/Xho rek. (Abb. 4.11.) verwendet. In einer PCR-ähnlichen Reaktion wurde nur mittels der überlappenden Primer und ohne Verwendung eines weiteren DNA-Templates ein neues Insert aus Doppelstrang-DNA hergestellt. Bei der Wahl der Primer wurde auf die entsprechende Homologie der überlappenden DNA-Fragmente zur Vektorsequenz am jeweiligen 5'Ende geachtet. Dadurch sollten Fehler bei der Rekombination vermieden werden. Ziel dieser Insert-Konstruktion war die Herstellung einer Eco/Xho Schnittstelle und ferner auch die korrekte Wiederherstellung des Glycin-Serin-Linkers.

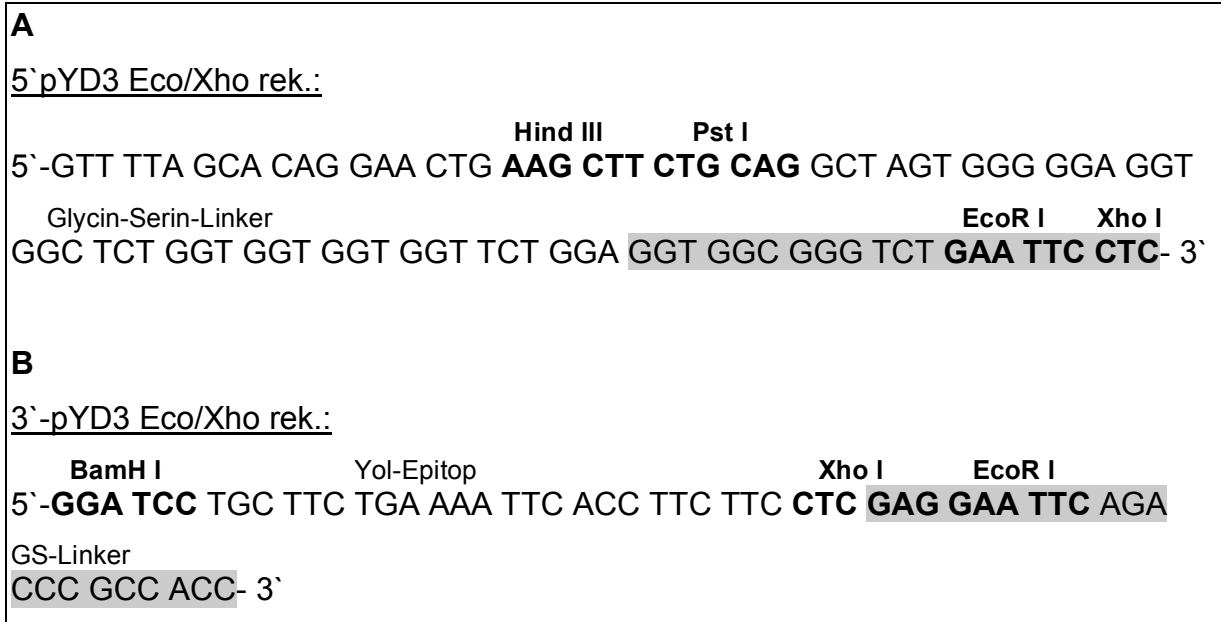


Abb. 4.11.: Schematische Darstellung der beiden Primer **A** 5'pYD3 Eco/Xho rek. und **B** 3'pYD3 Eco/Xho rek.. Man erkennt die langen Überhangstücke an beiden Enden, welche für die Rekombination in den Vektor benötigt werden. Die Überlappung der beiden Primersequenzen wurde markiert.

Der pYD3- β_2 -Mikroglobulin-Vektor und das PCR-Insert wurden nach der Gietz-Methode (3.5.2.) in EBY 100 Hefen transformiert, wo in vivo die Zusammenlagerung der DNA-Fragmente durch Rekombination stattfand. Der neue pYD3- β_2 -Mikroglobulin rekomb. Vektor wurde aus den Hefen isoliert und in E. coli Bakterien transformiert. Stichprobenartig wurden einzelne Bakterienkolonien mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten und der Verdau durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert (Abb. 4.12.). Das Ergebnis dieses Kontrollverdaus, wurde durch Negativkontrollen überprüft und mittels einer Sequenzierung bestätigt.

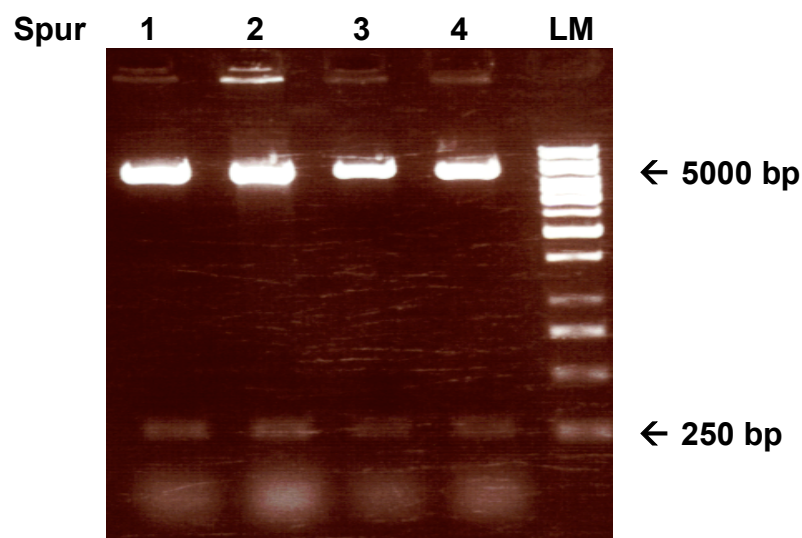


Abb. 4.12.: Agarosegelelektrophorese des pYD3- β_2 -Mikroglobulin rekomb. Verdau mit EcoRI. Durch die Lage der EcoRI-Schnittstelle auf der β_2 -Mikroglobulin light-chain und mit den Verdauprodukten kann man den Erfolg der Rekombination überprüfen. Die oberen Banden der Spuren 1 bis 4 zeigen den Vektor; die untere dünnen Banden (Spur 1 bis 4) das EcoRI-geschnittene Insert. Da bei dem Verdau Produkte mit einer Länge von etwa 260 bp entstanden sind, kann man auf eine korrekt erfolgte Rekombination schließen.

Mit dem Ziel, eine HLA A2 heavy-chain mit möglichst vielen Mutationen zu konstruieren, wurde eine Error Prone PCR wie unter 3.2.11. beschrieben mit dem ursprüngliche HLA A2 Template durchgeführt (Abb. 4.13.). Als Primer wurden der 5'HLA-A2mut rekomb. und der 3'HLA-A2mut rekomb. verwendet. Um die Mutationsrate noch weiter zu steigern, wurde im Anschluss an die erste Error Prone

PCR noch eine weitere durchgeführt, die als Template die Amplifikationsprodukte der ersten PCR benutzte.

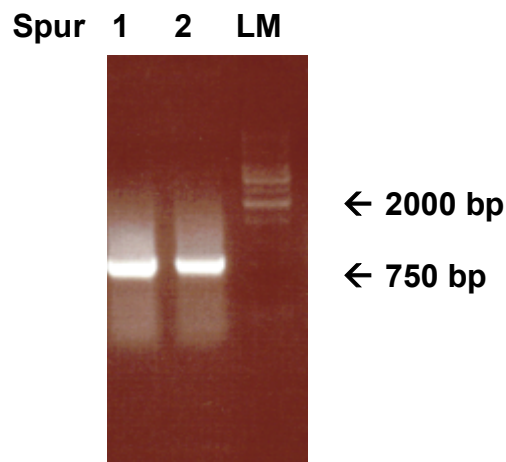


Abb. 4.13.: Agarosegelelektrophorese der Error Prone PCR (Spur 1 und 2). Der deutlich erkennbare Schmierfilm kommt durch kürzere und längere DNA-Fragmente aufgrund einer ungenauen Amplifikation durch die Zugabe von MgSO_4 und MnCl_2 zustande. Diese Zusatzstoffe wurden mit dem Ziel verwendet, möglichst viele Mutationen zu erhalten. Eine weitere Rolle spielen die unspezifischen Bedingungen, bei welchen diese PCR durchgeführt wurde. LM = 1 kb DNA-Längenmarker.

Zur Vorbereitung auf die Rekombination, wurde der pYD3- β_2 -Mikroglobulin rekomb. Vektor mit der Restriktionsendonuklease XhoI verdaut. Der geschnittene Vektor und das mutierte HLA A2 Insert wurden in EBY 100 Hefen transformiert und dort rekombiniert. Nach 2 Tagen Induktion, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt.

4.7. FACS-Analyse der mutierten HLA A2-Bank

FACSorting (Fluorescence activated cell sorting) ist die effizienteste Methode um Hefebanken zu screenen, wenngleich magnetische Sorting-Methoden ebenfalls gute Ergebnisse liefern (Boder et al., 1997; Kieke et al., 1997). Zur Optimierung der Erfolgsquote wurden von uns beide Methoden miteinander kombiniert. Zunächst wurde eine Kontrollfärbung der mutierten HLA A2-Bank durchgeführt. Analog der FACS-Färbungen (Abb. 4.14.) des pYD3-HLA A2- β_2 -Mikroglobulin Konstruktes wurden als Primärantikörper HLA-ABC Monoclonal Mouse anti-Human Antigen, Rabbit anti-Human Beta-2-Mikroglobulin, der HLA A2 spezifische Klon BB7.2 und

der anti-His-Tag Antikörper verwendet. Als Sekundärantikörper dienten ein Biotin-gekoppelter Anti-Mouse Antikörper und ein Biotin-gekoppelter Anti-Rabbit Antikörper. Als Negativkontrollen wurden die jeweiligen Sekundärantikörper verwendet.

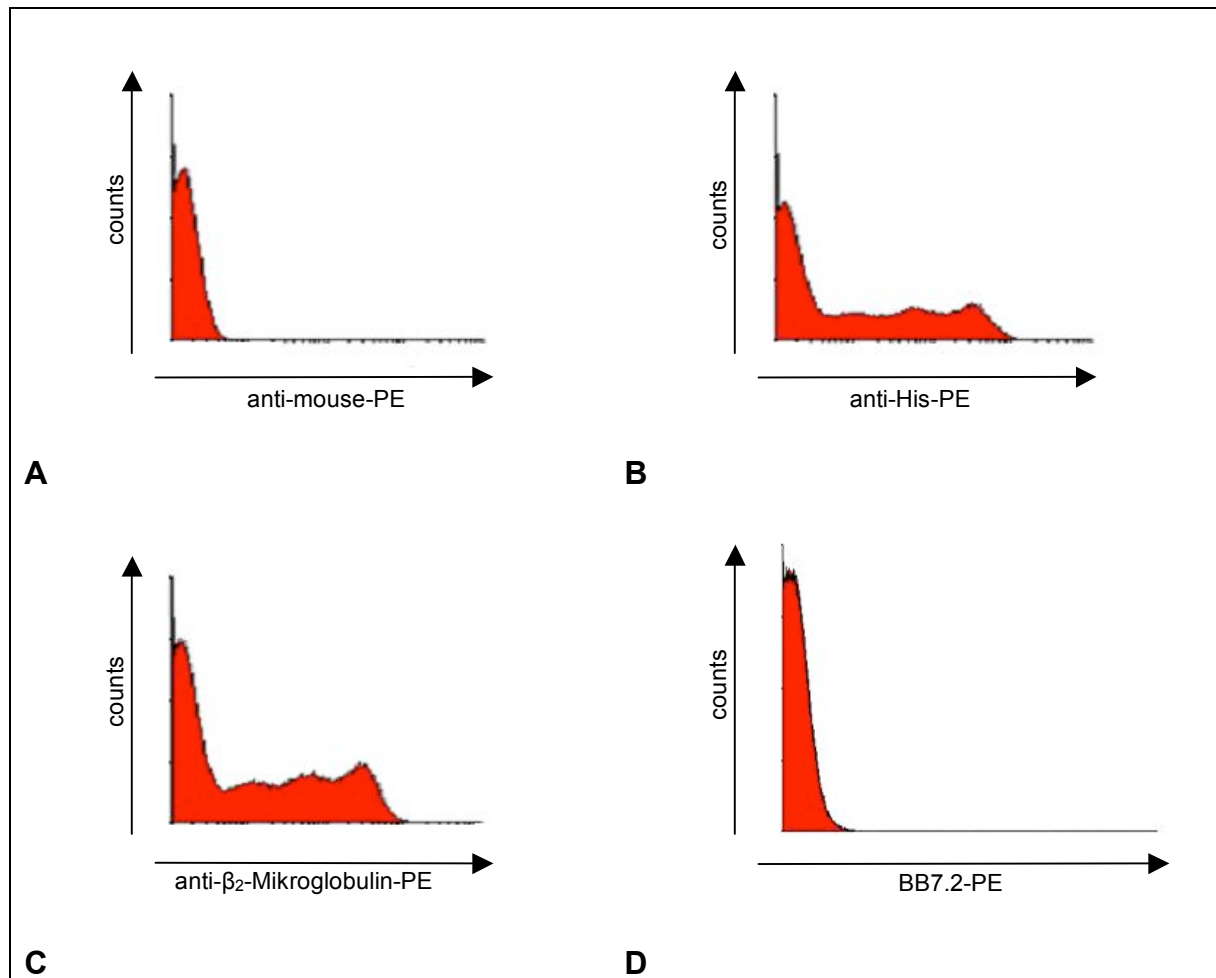


Abb. 4.14.: FACS-Analyse der HLA A2-Mutanten-Bank. Die Abbildungen **A** bis **D** geben die unterschiedlichen Ergebnisse aus den Immunfluoreszenzfärbungen wieder. **A** Negativkontrolle mit einem Biotin-gekoppelten anti-mouse Antikörper. **B** gibt eine anti-His-Färbung und **C** eine anti- β_2 -Mikroglobulin-Färbung wieder. Zur Überprüfungen der richtigen Faltung wurde unter anderem der Antikörper BB7.2 (**D**) verwendet. Zur weiteren Erklärung siehe Text.

Die erfolgte Expression des gesamten single-chain-Konstruktes auf der Hefeoberfläche ist anhand der positiven His-Färbung eindeutig zu erkennen. Ferner wurde auch die β_2 -Mikroglobulin Struktur bei der Mehrzahl der Klone korrekt erkannt. Die Färbungen mit dem BB7.2 – Antikörper zeigen ein negatives Ergebnis, was auf

eine inkorrekte Faltung der meisten Klone schließen lässt. Vergleicht man nun die BB7.2-Färbung der induzierten Hefen mit dem ursprünglichen pYD3-HLA A2- β_2 -Mikroglobulin Konstrukt mit der Färbung der mutierten HLA A2-Bank, so ist ein leicht positiver Shift der HLA A2-Bank zu erkennen, der aber eher als unspezifisch zu werten ist.

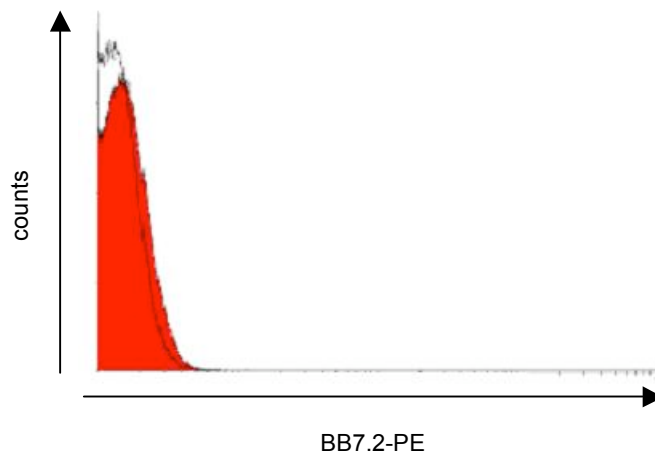


Abb. 4.15.: Vergleich einer FACS-Färbung von induzierten Hefen mit dem pYD3-HLA A2- β_2 -Mikroglobulin Konstrukt (schwarz) und einer FACS-Färbung der mutierten HLA A2-Bank (rot). Zur Färbung wurde der BB7.2 Antikörper verwendet. Es ist ein leicht positiver Shift der HLA A2-Bank gegenüber den ursprünglichen Hefen ohne HLA A2-Mutanten zu erkennen.

4.8. FACS-Analyse der MACS-Anreicherung der mutierten HLA A2-Bank

Zur Optimierung der Screening-Technik wurde die FACS-Analyse um das MACS (Magnetic associated cell sorting) erweitert (3.2.21.). Mit dieser Methode wurden BB7.2 positive Klone in der Probe angereichert und somit die Suche nach einem HLA A2-Klon mit richtiger Faltung spezifischer. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens war die gleichzeitige Elimination von Klonen, die unspezifisch auf den Sekundärantikörper reagierten. Zur Steigerung der Effektivität wurde der Durchfluss zweimal über die Säule gegeben und jeweils 4 Anreicherungsrounds durchgeführt. Zur Kontrolle erfolgten jeweils FACS-Analysen der BB7.2 Färbungen vor und nach der Anreicherung. Als Negativkontrolle diente jeweils eine FACS-Färbung mit einem anti-Mouse Sekundärantikörper (Abb. 4.16.).

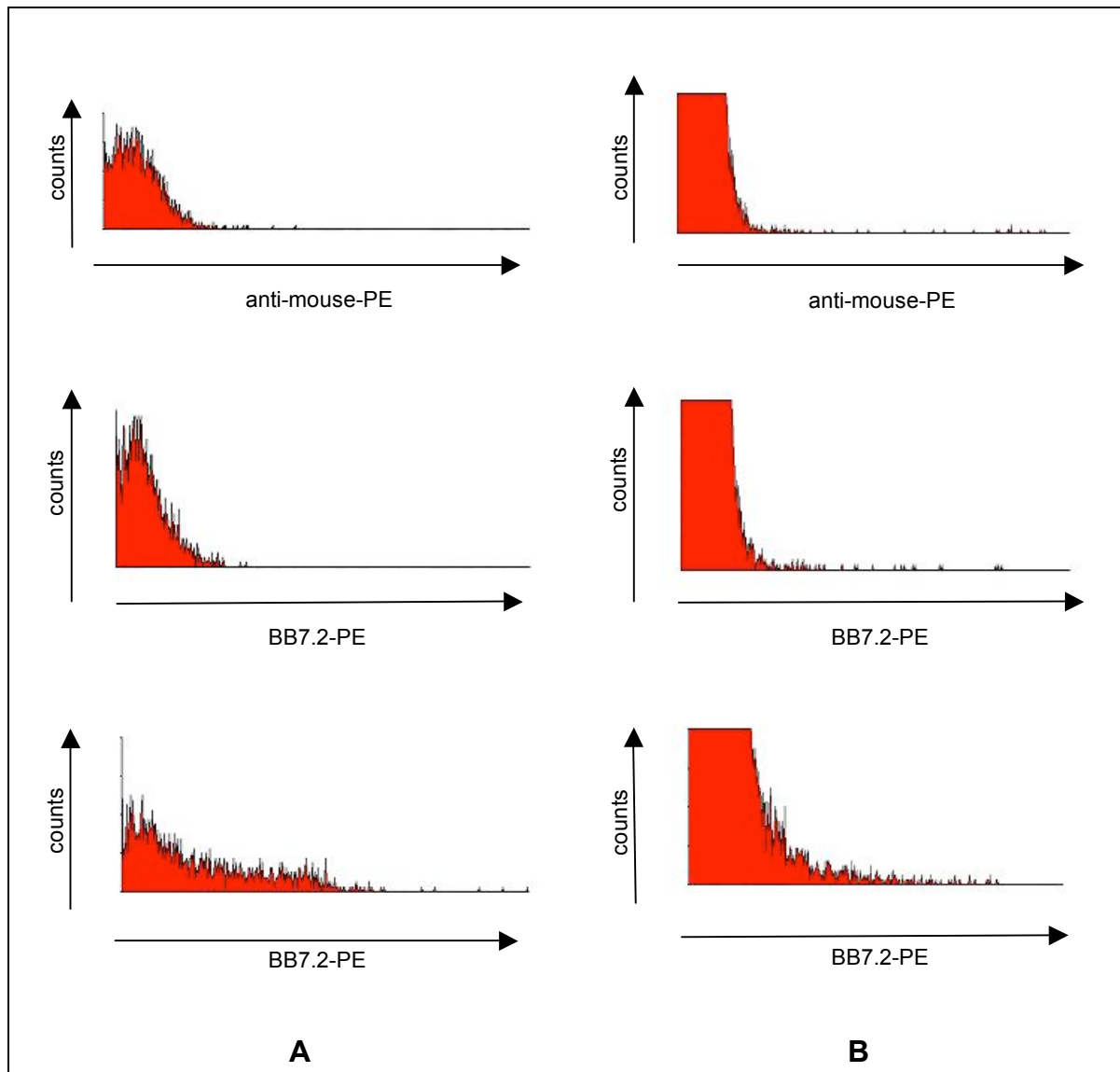


Abb. 4.16.: Histogrammdarstellung der FACS-Analysen nach MACS-Anreicherung. Die HLA A2-Bank wurde mit dem BB7.2 Antikörper gefärbt. **A** oben: Negativkontrolle. **A** Mitte: HLA A2-Bank vor der zweiten Anreicherung und **A** unten: HLA A2-Bank nach der zweiten MACS-Anreicherung. **B** oben: Negativkontrolle. **B** Mitte: HLA A2-Bank vor der vierten Anreicherung und **B** unten: HLA A2 nach der vierten MACS-Anreicherung.

Vergleicht man jeweils die FACS-Färbungen vor und nach einem MACS-Durchlauf, so erkennt man eine Anreicherung. Die Färbung der zweiten MACS-Anreicherung zeigt im Vergleich zur Färbung nach der ersten MACS-Anreicherung im Bezug auf die Negativkontrolle ein positives Ergebnis. Bei Fortführung des Verfahrens und bei weiteren folgenden Anreicherungsrounds verringert sich die zunächst gesehene Anreicherung wieder. Durch mangelnde Kontinuität der Ergebnisse, konnte dieses Verfahren nicht zur verlässlichen Anreicherung der BB7.2 positiven Klone verwendet

werden. Somit wurde mittels MACS-Anreicherung und kombiniertem FACS kein mutierter HLA A2-Klon mit richtiger Faltung gefunden. Die gesehene Anreicherung ist damit als unspezifisch zu werten.

4.9. FACS-Parameter und Sortlogik

Um eine möglichst effiziente Selektion von positiven Klonen zu gewährleisten, müssen am FACSorter gewisse Einstellungen vorgenommen werden. Zunächst stellt man das Gerät im forward–side-scatter Diagramm auf eine möglichst vitale Hefepopulation ein. Auf der FSC-Achse ist die gemessene Zellgröße aufgetragen, auf der SSC-Achse die Granularität. Aufgrund dieser Angaben wurde im Dotplot das Gate (Abb. 4.17.) so gewählt, dass nicht zu kleine Einzelzellen mit geringer Granulation erfasst werden. Die im gewählten Gate erfassten Hefezellen wurden bezüglich der Fluoreszenzintensität untersucht (zweiter Dotplot Abb. 4.16.). Die spezifische Färbung wurde mit einem Phycoerythrin (PE) markierten Sekundärantikörper im FL2-Kanal des FACSorters erfasst. Durch entsprechende Auswahl des Sortfensters (Abb. 4.17.) wurden nur die intensiv leuchtenden Ereignisse im linken oberen Quadranten aussortiert, was für eine starke Antigen-Antikörperbindung spricht. In der Regel wurden Ereignisse mit einer Intensität $> 10^2$ als positiv gewertet.

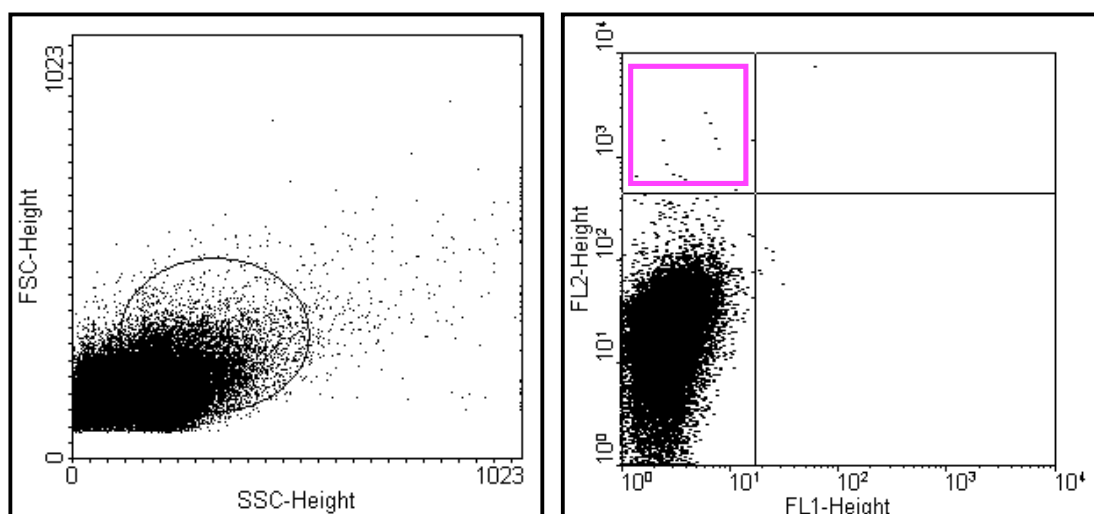


Abb. 4.17.: Darstellung des Dotplots mit Gate und Sortfenster. Beschreibung siehe Kapitel 4.9..

4.10. Zellsorting der HLA A2-Mutanten-Bank

Auf der Suche nach einem mutierten HLA A2-Klon mit richtiger Faltung wurde die HLA A2-Mutanten-Bank durchflusszytometrisch untersucht und sortiert. Mit Hilfe eines Cell-Sorters sollten Hefen mit richtiger HLA A2-Faltung von Hefen ohne korrekte Faltung isoliert werden. Anschließend wurden die als positiv isolierten Hefen mittels FACS analysiert. Dabei wurden als Primärantikörper der anti- β_2 -Mikroglobulin Antikörper und der konformationsabhängige BB7.2 Antikörper eingesetzt. Die entsprechenden Sekundärantikörper wurden ebenfalls zur Negativkontrolle verwendet.

Die FACS-Auswertung der anti- β_2 -Mikroglobulin-Färbung zeigte wie erwartet ein positives Ergebnis. Jedoch war die BB7.2-Antikörper-Färbung immer noch negativ. Es war also auch mit dieser Methode nicht möglich, einen HLA A2-Klon mit richtiger Faltung zu isolieren.

Somit waren die Ergebnisse mit denen der vorherigen Versuchsreihen vergleichbar. Die gesorteten Klone müssen als unspezifisch angefärbt, und damit falsch positiv gewertet werden. Der Sortvorgang wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Andreas Wadle im onkologischen Labor durchgeführt.

4.11. Zusammenfassende Übersicht

Für die Expression korrekt gefalteter HLA A2-Proteine auf der Hefeoberfläche wurden von uns mehrere Lösungsstrategien entwickelt und deren Einfluss auf die Proteinkonformation mittels FACSorting untersucht. Zunächst erfolgte eine Verlagerung der AGA 2-Position im Hefeoberflächenexpressionsvektor vom N-terminalen Ende an das C-terminale Ende. Außerdem wurden verschiedene single-chain-Varianten entwickelt (Abb. 4.18.). Diese unterschieden sich in der Lage der HLA A2 heavy-chain und der β_2 -Mikroglobulin light-chain.

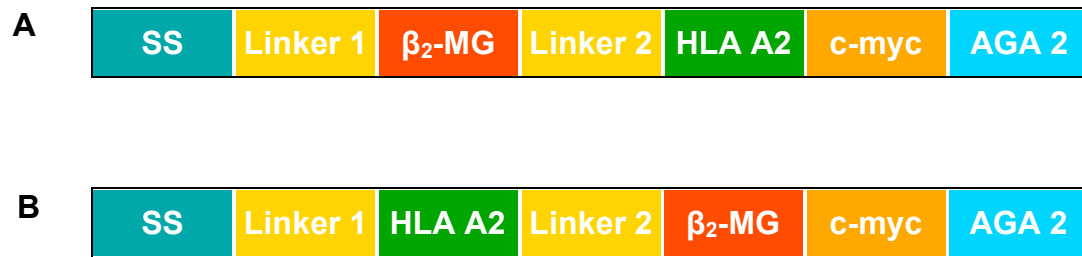


Abb. 4.18.: Vereinfachte schematische Darstellung der single-chain-Konstrukte mit jeweils unterschiedlicher Lage der HLA A2 heavy-chain und der β_2 -Mikroglobulin light-chain: **A** pYD2- β_2 -Mikroglobulin-HLA A2 Konstrukt und **B** pYD2-HLA A2- β_2 -Mikroglobulin-Konstrukt. SS = Signal-Sequenz.

Da mit Hilfe dieser Lösungsansätze kein HLA A2-Protein mit korrekter Faltung exprimiert werden konnte, entwickelten wir eine HLA A2-Mutantenbank mittels „error prone PCR“ und homologer Rekombination. Allerdings konnte auch mit dieser Lösungsstrategie kein richtig gefalteter HLA A2-Hefeklon durch FACSorting isoliert werden.

5. Diskussion

Die vorausgegangenen Arbeitsschritte verdeutlichen den mehrfach vergeblichen Versuch, korrekt gefaltete HLA A2-Moleküle auf der Hefeoberfläche zu exprimieren. Dazu benutzten wir ein kommerziell erhältliches Hefeoberflächenexpressionssystem (Invitrogen), das nach Bedarf modifiziert wurde. Diese Expressionsmethode wurde häufig verwendet, um unter anderem single-chain Antikörper und single-chain T-Zell-Rezeptoren in einem robusten System zu exprimieren und zu charakterisieren (Griffin et al., 2001; Holler et al., 2003; Miller et al., 2005; Boder et al., 2000; Boder and Wittrup 1997). Bei HLA-Proteinen stellt dies allerdings ein größeres Problem dar, da verschiedene Proteinanteile zusammengesetzt werden müssen, um so einen stabilen Komplex zu bilden. Die HLA A2-Struktur konnte zwar vollständig auf der Hefeoberfläche dargestellt und nachgewiesen werden, jedoch stets mit einer falschen Proteinkonformation. Die verschiedenen Lösungsansätze um eine korrekte HLA A2-Faltung zu erzielen, wurden in dieser Arbeit mit den Methoden der Immunfluoreszenz qualitativ untersucht.

5.1. Lösungsstrategien durch Vektorumstellung

Mit dem Ziel ein HLA A2-Molekül mit korrekter Proteinkonformation zu erhalten, wurden verschiedene single-chain Konstrukte hergestellt und diese in einen Hefeoberflächenexpressionsvektor kloniert. Dazu wurden verschiedene Lösungsstrategien entwickelt und die single-chain mehrfach umgestellt. Des weiteren wurde auch der Expressionsvektor überarbeitet und seine Sequenz verändert.

In einer jüngeren Studie von Brophy et al. (2003), wird ein Hefeoberflächenexpressionsvektor beschrieben, bei dem das AGA 2-Gen an das C-terminale Ende kloniert wurde. Da diese Arbeitsgruppe damit positive Ergebnisse erzielt hatte, wurde von uns der ursprüngliche Oberflächenexpressionsvektor entsprechend umgestellt. Allerdings führten die zahlreichen Versuchsreihen mit diesem Vektor nicht zum Erfolg.

5.2. Single-chain Varianten

MHC Klasse I Komplexe sind Heterodimere, welche aus einer polymorphen heavy-chain und einer nicht-kovalent angegliederten β_2 -Mikroglobulin light-chain bestehen. Zahlreiche single-chain Varianten bestehend aus heavy-chain, β_2 -Mikroglobulin und manchmal auch Verbindungen mit Peptiden wurden bereits untersucht. Es wurden mehrfach single-chain Konstrukte kloniert, bei denen das C-terminale Ende des β_2 -Mikroglobulin über einen Linker mit dem N-terminalen Ende der heavy-chain verbunden ist (β_2 -MG-Linker-heavy-chain, Oved et al., 2005, Yu et al., 2002; Mage et al., 1992). Die single-chain Proteine konnten auf verschiedenen Zellen exprimiert werden, waren stabil und fähig zur Peptidpräsentation (Mage et al., 1992; Lee et al., 1994). Auch bei den MHC Klasse II Komplexen wurden Heterodimere kloniert. Dies waren kovalente Verbindungen aus Peptid, light-chain und heavy-chain (Peptid-Linker-light-chain-Linker-heavy-chain, Zhu et al., 1997). In einer jüngeren Studie wurden single-chain Klasse I Moleküle entwickelt, um eine größere Stabilität gegenüber einer Down-Regulation durch Viren zu gewährleisten. Es wurde ein single-chain Konstrukt mit kovalenter Struktur nach dem Schema Peptid-Linker- β_2 -MG-Linker-heavy chain entwickelt. Diese Proteine wurden als ungewöhnlich stabil beschrieben (Yu et al., 2002).

In diesen Studien konnten die β_2 -Mikroglobulin-Linker-heavy-chain-Strukturen erfolgreich auf der Oberfläche verschiedener Zellen exprimiert werden. Die single-chain Konstrukte behielten ihre Struktur, waren stabil und konnten sehr effizient hergestellt werden. Außerdem konnten in diese single-chain Konstrukte auch Antigen-Peptide kloniert werden, welche ebenfalls an die Zelloberfläche gebracht wurden und dort zu einer Stimulation der T-Zellen führten.

Im Bezug auf diese Ergebnisse wählten wir die gleiche Klonierungsstrategie für unser HLA A2 single-chain Konstrukt. Dabei wurde das C-terminale Ende des β_2 -Mikroglobulin kovalent über einen Linker mit dem N-terminalen Ende der heavy-chain verbunden. Diese single-chain wurde in den Hefeoberflächenexpressionsvektor kloniert und auf die Hefeoberfläche exprimiert. Allerdings war mittels konformationsabhängiger HLA A2-Antikörper keine korrekte Proteinfaltung nachweisbar.

5.3. Umstellung der ursprünglich gewählten single-chain

MHC Klasse I Moleküle können als single-chain Konstrukte exprimiert werden, wobei die β_2 -Mikroglobulin light-chain und die heavy-chain durch flexible Linker verbunden werden können (Lybarger et al., 2003). Diese Überlegung und der beschriebene Misserfolg führten zu der Entwicklung einer neuen Lösungsstrategie. Dabei sollte das single-chain Konstrukt neu kloniert werden und die β_2 -Mikroglobulin light-chain und die HLA A2 heavy-chain umgestellt werden.

In einer älteren Studie wurden bereits single-chain MHC Klasse I Konstrukte untersucht, bei denen die heavy-chain kovalent mit dem β_2 -Mikroglobulin verbunden ist (heavy-chain-Linker- β_2 -Mikroglobulin). Diese single-chain Proteine konnten auf COS-1 Zellen exprimiert werden (Mottez et al., 1991). Dieses Konstrukt überzeugte auch dadurch, dass es die gleiche Art und Menge an Peptiden binden konnte, wie die normalerweise nicht-kovalent verbundenen Komplexe aus Peptid, heavy-chain und β_2 -Mikroglobulin light-chain (Abastado et al., 1993). Eine weiterführende Studie zeigte die Möglichkeit auf, spezifische Peptide kovalent über einen Linker an das N-terminale Ende der heavy-chain-Linker- β_2 -Mikroglobulin Konstruktion zu binden. Somit erhielt man eine sehr immunogene Struktur (Mottez et al., 1995).

In einer jüngeren Studie über murine MHC Klasse I Komplexe wurde mehrfach ein Ansatz gewählt, bei dem die murine β_2 -Mikroglobulin light-chain kovalent an das C-terminale Ende der murinen heavy-chain gebunden ist. Die Verbindung erfolgte über einen flexiblen Linker. Als Varianten wurden an das N-terminale Ende dieser single-chain verschiedene spezifische Peptide kloniert (Peptid-Linker-heavy-chain-Linker- β_2 -MG). Diese murine single-chain Form konnte auch in Verbindung mit dem AGA 2-Gen auf der Oberfläche von Hefen exprimiert werden (Brophy et al., 2003). In Anlehnung an diese Studien haben wir die humane HLA A2 single-chain umgestellt und in umgekehrter Reihenfolge kloniert. Dabei wurde die heavy-chain an ihrem C-terminalen Ende über einen Linker mit der β_2 -Mikroglobulin light-chain verknüpft (heavy-chain-Linker- β_2 -Mikroglobulin).

Nach der Umstrukturierung der single-chain ist es uns zwar gelungen, das humane HLA A2-Konstrukt an der Hefeoberfläche darzustellen, allerdings konnte eine korrekte Proteinkonformation ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

5.4. Herstellung einer HLA A2-Mutanten Bank als Lösungsstrategie

Da es uns mit den beschriebenen Lösungsansätzen durch Umstellung der single-chain und der Vektorveränderung nicht gelungen ist, ein HLA A2-Molekül mit korrekter Faltung zu exprimieren, haben wir als weitere Lösungsstrategie die Entwicklung einer Mutantenbank gewählt. In einer Studie von Colby et al. (2004) wurde nach dem Prinzip der homologen Rekombination eine Antikörper-Mutantenbank hergestellt und die Klone auf der Hefeoberfläche exprimiert. Anschließend wurde die Bank durchflusszytometrisch nach den Antikörpern mit gewünschter Morphologie abgesucht (Colby et al., 2004). In einer weiteren Studie wurde ebenfalls das Prinzip der homologen Rekombination in vivo zur Herstellung einer gemischten Antikörperbank verwendet und die Klone auf der Oberfläche von Hefen dargestellt (Swers et al., 2004).

Esteban und Zhao nutzen ebenfalls das Hefeoberflächenexpressionssystem, um MHC Klasse II single-chain Konstrukte zu exprimieren. Zur Konformationsoptimierung stellten sie mit Hilfe der Error Prone PCR eine MHC-Mutanten Bank her und konnten durch FACSScreening MHC-Klone mit korrekter Proteinkonformation auf Hefeoberflächen nachweisen (Esteban et Zhao, 2004). Da zusätzlich zu diesen Ergebnissen die homologe Rekombination als einfache und zugleich effiziente Methode beschrieben wird, um eine Mutantenbank in Hefekulturen herzustellen (Ma et al., 1987; Mezard et al., 1992; Raymond et al., 1999; Abecassis et al., 2000), nutzten wir ebenso dieses Prinzip zusammen mit der Error Prone PCR für unsere Zwecke. Mit dieser Methode konnte die Ligation umgangen und eine große HLA A2-Mutantenbank angelegt werden. Es wurde ebenfalls das Hefeoberflächenexpressionssystem zur Darstellung der HLA A2-Mutanten an der Hefeoberfläche genutzt. Unser Ziel war es, unter den Mutanten mittels MACS-Anreicherung und FACS-Analyse einen HLA A2-Klon mit korrekter Proteinkonformation zu finden (Brophy et al., 2002; VanAntwerp et Wittrup, 2000; Yeung et Wittrup, 2002). Letztlich blieb die Problematik der inkorrekten Konformation bestehen und wir konnten auch mit diesem Verfahren kein HLA A2-Protein mit richtiger Faltung auf der Hefeoberfläche isolieren.

5.5. Konformationsänderung durch Glykosilierung

Es stellt sich bei diesen mehrfach durchgeführten Untersuchungen zur Hefeexpression korrekt gefalteter HLA A2-Proteine die Frage, wo letztlich die Problematik der inkorrekten Konformation begründet liegt. Eine neu synthetisierte Aminosäurekette ist keineswegs nach ihrer Entstehung sofort funktionsfähig. Dies gilt sowohl für die Synthese in humanen Zellen, wie auch in Hefezellen. Es muss zuerst die für jedes Protein spezifische Faltung oder Konformation eingenommen werden (Jaenicke et Buchner, 1993; Jaenicke, 1995).

Ein wichtiger Aspekt im Bezug auf die korrekte Faltung von humanen Proteinen ist die co- und posttransionale Modifikation. Neben den Modifikationen wie zum Beispiel gezielte Proteolyse und Acetylierung, spielt Glykosilierung, als häufigste Proteinmodifikation, eine tragende Rolle. Glykoproteine kommen vor allem in eukaryoten Zellen vor. Hierbei werden bei Membranproteinen und sezernierten Proteinen, Kohlenhydratseitenketten an die Aminosäuren Serin und Threonin (O-glykosidisch) bzw. Asparagin (N-glykosidisch) geknüpft (Lis et Sharon , 1993; Opdenacker et al., 1993). Durch diese Glykosilierung kann es zu Änderungen der Proteinkonformation kommen. In einer jüngeren Studie wird belegt, dass die Glykosilierung auch die helikale Struktur von Polypeptiden beeinflussen kann (Vijayalekshmi et al., 2003). Andererseits ist die Bildung von Glykoproteinen auch von großer Bedeutung. Sie dienen zum Beispiel als Immunglobuline, als Transportmoleküle (Hayes et al., 1994), sowie als enzymatische Bestandteile des Blutgerinnungs-, Fibrinolyse- und Komplementsystems (Pittman et al., 1994). Sehr vielfältig sind auch die Funktionen der Membranglykoproteine. Sie bilden Rezeptoren und vermitteln viele Zell-Zell-Wechselwirkungen, zum Beispiel als Bestandteile der Histokompatibilitäts-Antigene.

Im Gegensatz dazu glykosilieren die Hefezellen ihre Proteine in einem größeren Ausmaß als humane Zellen, was die Konformation dieser Proteine wesentlich beeinflussen kann. Eine Studie unterstützt unter anderem die Hypothese, dass Glykoproteinen bei der Faltung der Polypeptidketten und ihrer Stabilisierung eine wichtige Funktion zukommt. Bei Deglykosilierungs-Versuchen konnte unter anderem eine geringere Stabilität gegenüber Temperaturänderungen beobachtet werden, als

bei den entsprechenden nativen Polypeptiden (Wang et al., 1992). Somit liegt die Überlegung nahe, dass eine überschießende Glykosilierung ebenfalls Einfluss auf die Stabilität und Konformation von Polypeptiden haben kann. Einer weiteren Studie zu Folge, beeinflusst die Glykosilierung als posttranslationale Modifikation die heterologe Darstellung von Proteinen auf Hefezellen und deutet somit die Grenzen der Hefeoberflächenexpression an (Pathasarathy et al., 2006).

Aufgrund einer gesteigerten Rigidität der exprimierten Proteinstruktur durch Kohlenhydratseitenketten, wird die Konformationsmobilität eingeschränkt. Dies konnte bei der Proteinexpression auf *Pichia Pastoris* festgestellt werden (Yoshimasu et al., 2004). In einer weiteren Studie wurde der Effekt der Glykosilierung auf die Struktur des humanen Serumalbumin untersucht. Dabei wurde bei Verwendung eines Hefeoberflächenexpressionssystems eine geringe Konformationsänderung der Serumalbumine beobachtet (Nakajou et al., 2003).

Vor dem Hintergrund dieser Untersuchungsergebnisse könnte es sein, dass die Ursache der inkorrekten Faltung der HLA A2-Proteine in der posttranslationalen Modifikation liegen könnte. Die Glykosilierung durch Hefezellen verläuft anders, als die humaner Zellen (Orlean et al., 1991; Livi et al., 1990). Wird nun ein menschliches Protein, wie das HLA A2, auf einer Hefeoberfläche exprimiert, kann es durch die Anlagerung von Kohlenhydratseitenketten zu einer leichten Konformationsänderung kommen (Nakajou et al., 2003). Dabei reicht eine geringe Änderung der Raumstruktur aus, damit die konformationsabhängigen Antikörper BB7.2 und HLA-ABC nicht effizient binden können und bei der FACS-Analyse nicht darstellbar sind.

5.6. Mangelnde Antikörperbindung durch Glykosilierung

Des weiteren schließt sich die Überlegung an, dass aufgrund der Glykoproteinbildung keine effiziente Bindung der konformationsabhängigen Antikörper BB7.2 und HLA-ABC zustande kommen könnte. Durch die Anlagerung der zahlreichen Kohlenhydratseitenketten an das HLA A2-Protein während der Glykosilierung, könnten die Bindungsstellen für die Antikörper sozusagen blockiert sein. Dies würde

bei der FACS-Analyse trotz korrekter Proteinkonformation ein negatives Ergebnis liefern.

5.7. Ausblick

Durch die Glykosilierung könnten die Bedingungen für eine Bindung der konformationsabhängigen Antikörper BB7.2 und HLA-ABC an das HLA A2-Protein erschwert sein. Somit wäre keine eindeutige Aussage über die Korrektheit der Proteinfaltung möglich. Um diese Problematik zu umgehen, könnten T-Zell-Assays eingesetzt werden. Ist die Konformation des HLA A2-Proteins korrekt, so entsteht durch die Faltung ein Spalt, indem spezifische Peptide gebunden werden können (Madden D.R., 1995). Diese Peptidbindung erfolgt jedoch nur in Abhängigkeit von der richtigen Konformation. Esteban und Zhao nutzten die Spezifität der Peptidbindung, um die korrekt erfolgte Proteinfaltung von MHC Klasse II auf Hefeoberflächen zu untersuchen. Dabei überprüfte man die Bindung zwischen scDR1 $\alpha\beta$ -Mutanten und den DR-spezifischen Peptiden HA₃₀₆₋₃₁₈ (Esteban and Zhao, 2004). Mit dem T-Zell-Assay können diese spezifischen Peptide genau erkannt werden. Analog dazu könnte mit einem geeigneten NY-ESO-1-Peptid (z.B. 157-165) ein Peptid/HLA A2-Komplex gebildet werden, welcher von spezifischen T-Zellen erkannt wird (Jager et al., 2000). Dieser Komplex kommt nur bei korrekter Faltung des HLA A2 zustande und somit werden auch nur HLA A2-Proteine mit richtiger Konformation mittels T-Zell-Assay identifiziert. Voraussetzung ist allerdings das Vorhandensein eines spezifischen T-Zellklons. Diese Methode wurde schon mehrfach zur Identifikation von Peptiden verwendet und spielt eine wichtige Rolle bei der Erforschung der Vakzinierung (Guinn et al., 2005; Kather et al., 2003).

5.8. Alternative Expressionssysteme

Um das Hefeoberflächenexpressionssystem zur Darstellung von HLA A2-Proteinen auf Hefezellen als Fehlerquelle für eine inkorrekte Proteinkonformation zu umgehen, könnten zum Beispiel zur HLA A2-Expression (humane) Zelllinien verwendet werden. Eine weitere Möglichkeit wäre unter anderem die HLA A2-Darstellung in Kombination

mit Peptiden mittels Phagen-Technik. Diese Technik wurde bereits in mehreren Studien verwendet und die dargestellten Komplexe konnten mit konformationsabhängigen Antikörpern untersucht werden (Le Doussal et al., 2000; Vest Hansen et al., 2001; Kurokawa et al., 2002). Bei der HLA A2-Expression mittels Säugetierzellen ist eine Konformationsänderung durch überschießende oder falsche Glykosilierung unwahrscheinlich. Außerdem behindern keine überschüssigen Kohlenhydratseitenketten die Bindung der konformationsabhängigen Antikörper. Da es sich um die Expression menschlicher Proteine handelt, kann man bei der Verwendung von Säugetierzellen zur Darstellung von HLA A2 Proteinen von der geringsten Beeinträchtigung der Konformation durch posttranslationale Modifikation ausgehen (Kawana-Tachikawa et al., 2002).

Durch die Verwendung alternativer Expressionssysteme würden allerdings die Vorzüge der Hefeoberflächenexpression verloren gehen. Dazu zählen unter anderem das sehr einfache Hantieren mit Hefezellen und die Möglichkeit, in kurzer Zeit große Proteinmengen zu produzieren. Darüber hinaus ist die Verwendung von humanen Zelllinien und Phagen als alternative Expressionssysteme (Chiswell et McCafferty, 1992; Kondo et Ueda, 2004) aufwendiger und teurer als die HLA A2-Expression auf Hefeoberflächen.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Abastado J.P., Ojcius D.M., Casrouge A., Yeh P., Schumacher T.N., Ploegh H.L., Kourilsky P.: A soluble, single-chain K^d molecule produced by yeast selects a peptid repertoire indistinguishable from that of cell-surface-associated K^d. *Eur. J. Immunol.* 23: 1776-1783, 1993.
- (2) Abecassis V., Pompon D., Truan G.: High efficiency family shuffling based on a multi-step PCR and in vivo DNA recombination in yeast: statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome p450 1A1 and 1A2. *Nucleic Acids Res.* 28: E88, 2000.
- (3) Allan C.P., Turtle C.J., Mainwaring P.N., Pyke C., Hart D.N.: The immune response to breast cancer, and the case for DC immunotherapy. *Cytotherapy* 6:154-65, 2004.
- (4) Appel H., Kuon W., Kuhne M., Wu P., Kuhlmann S., Kollnberger S., Thiel A., Bowness P., Sieper J.: Use of HLA-B27 tetramers to identify low-frequency antigen-specific T-cells in Chlamydia-triggered reactive arthritis. *Arthritis Res Ther.* 6: R 521-534, 2004.
- (5) Aruffo A., Farrington M., Hollenbaugh D., Li X., Milatovich A., Nonoyama S., Bajorath J., Grosmaire L.S., Stenkamp R., Neubauer M.: The CD40 ligand gp39 is defective in activated T cells from patients with X linked hyper-IgM Syndrome. *Cell* 72: 291-300, 1993.
- (6) Baselga J., Tripathy D., Mendelsohn I., Baughman S., Benz C.C., Dantis L., Sklarin N.T., Seidman A.D., Hudis C.A., Moore I., Rosen P.P., Twaddell T., Henderson I.C., Norton L.: Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER 2/neu – overexpressing metastatic breast cancer. *Semin Oncol.*, 26: 78-83, 1999.

-
- (7) Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L., Wiley D.C.: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA A2. *Nature* 329, 506-512, 1987.
 - (8) Bjorkman P.J., Strominger J.L., Wiley D.C.: Crystallization and X-ray diffraction studies on the histocompatibility antigens HLA A2 and HLA A28 from human cell membranes. *J Mol Biol.* 186, 205-210, 1985.
 - (9) Blaise L., Wehnert A., Steukers M., Van Den Beuken T., Hoogenboom H.R., Hufton S.E.: Construction and diversification of yeast cell surface display libraries by yeast mating: application to the affinity maturation of Fab antibody fragments. *Gene* 342: 211-8, 2004.
 - (10) Bodemer J.G., Marsh S.G.E., Albert E.D., Bodemer W.F., Du Pont B., Erlich H.A., Mach B., Mayr W.R., Parham P., Saszaki T. et al: Nomenclature for Factors of the HLA System 1991. *Tissue Antigens*, 39: 161-173, 1992.
 - (11) Boder E.T., Wittrup K.D.: Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.*, 15: 553-7, 1997.
 - (12) Boder E.T., Wittrup K.D.: Optimal screening of surface-displayed polypeptide libraries. *Biotechnol. Prog.*, 14: 55-62, 1998.
 - (13) Boon T. and Old L.J.: Cancer tumor antigens, *Curr. Opin. Immunol.*, 9: 681-683, 1997.
 - (14) Brophy S.E., Holler P.D., Kranz D.M.: A yeast display system for engineering functional peptide – MHC complexes. *Journal of Immunological Methods*, 272: 235-246, 2003.
 - (15) Cappellaro C., Baldermann C., Rachel R., Tanner W.: Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of α - and α -agglutinin. *EMBO J*, 13: 4737-44, 1994.

-
- (16) Cappellaro C., Hauser K., Mrsa V., Watzle M., Watzle G., Gruber C., Tanner W.: *Saccharomyces cerevisiae* α - and α -agglutinin: characterization of their molecular interaction. *EMBO J*, 10: 4081-8, 1991.
- (17) Chen Y.T., Scanlan M.J., Sahin U., Tureci O., Gure A.O., Tsang S., Williamson B., Stockert E., Pfreundschuh M., Old L.J.: A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1914-1918, 1997.
- (18) Chiswell D.J., Mc Cafferty J.: Phage antibodies: will new “coliclonal” antibodies replace monoclonal antibodies? *Trends Biotechnol.* 10: 80-84, 1992.
- (19) Cochran J.R., Kim Y.S., Olsen M.J., Bhandari R., Wittrup K.D.: Domain-level antibody epitope mapping through yeast surface display of epidermal growth factor receptor fragments. *Journal of Immunological Methods* 287: 147-158, 2004.
- (20) Colby D.W., Kellog B.A., Graff C.P., Yeung Y.A., Swers J.S., Wittrup K.D.: Engineering antibody affinity by yeast surface display. *Methods Enzymol.* 388: 348-58, 2004.
- (21) Davis I.D., Chen W., Jackson H., Parente P., Shackleton M., Hopkins W., Chen Q., Dimopoulos N., Luke T., Murphy R., Scott A.M., Maraskovsky E., McArthur G., MacGregor Duncan D., Sturrock S., Tai T.Y., Green S., Cuthbertson A., Maher D., Miloradovic L., Mitchell S.V., Ritter G., Jungbluth A.A., Chen Y.T. Gnjjatic S., Hoffman E.W., Old L.J., Cebon J.S.: Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4⁺ T cell responses in humans. *PNAS* 101: 10697-10702, 2004.
- (22) Driscoll P.C.: Difficult Proteins – the Bloombury experience. CCPN Weekend Conference: NMR of non-ideal proteins: Producing and characterisation samples for NMR studies, Homerton College, Cambridge, 2002.

-
- (23) Esteban O., Zhao H.: Directed evolution of soluble single-chain human Class II – MHC molecules. *J. Mol. Biol.* 340: 81-95, 2004.
- (24) Feldhaus M.J., Siegel R.W., Opresko L.K., Coleman J.R., Warer Feldhaus J.M., Yeung Y.A., Cochran J.R., Heinzelman P., Colby D., Swers J., Graff C., Willey H.S., Wittrup K.D.: Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display system. *Nature biotechn.* 21, 2003.
- (25) Germain R.N.: MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76: 287-299, 1994.
- (26) Gietz R.D., Woods R.A.: Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.*, 350: 87-96, 2002.
- (27) Griffin M.D., Holman P.O., Tang Q., Ashourian N., Korthauer U., Kranz D.M., Bluestone J.A.: Development and applications of surface-linked single chain antibodies against T-cell antigens. *J. Immunol. Methods* 248: 77-90, 2001.
- (28) Grothey A.: Clinical management of oxaliplatin-associated neurotoxicity. *Clin. Colorectal Cancer Suppl* 1: 538-46, 2005.
- (29) Guinn B.A., Bland E.A., Lodi U., Liggins A.P., Tobal K., Petters S., Wells J.W., Banham A.H., Mufti G.J.: Humoral detection of leukaemia-associated antigens in presentation acute myeloid leukaemia. *Biochem Biophys Res* 335: 1293-1304, 2005.
- (30) Hato S., Pietsch J., Shankar S.: Intestinal complication in children undergoing chemotherapy for mediastinal non-Hodgkin's lymphoma. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 21: 707-10, 2004.

-
- (31) Held G., Matsuo M., Epel M., Gnjatich S., Ritter G., Lee S.Y., Tai T.Y., Cohen C.J., Old L.J., Pfreundschuh M., Reiter Y., Hoogenboom H.R., Renner C.: Dissecting cytotoxic T cell responses towards the NY-ESO-1 protein by peptide/MHC-specific antibody fragments. *Eur J. Immunol.* 34: 2919-2929, 2004.
- (32) Holler P.D., Holman P.O., Shusta E.V., O'Herrin S., Wittrup K.D., Kranz D.M.: In vitro evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5387-5392, 2000.
- (33) Holler P.D., Chlewicki L.K., Kranz D.M.: TCRs with high affinity for foreign pMHC show self-reactivity. *Nat. Immunol.* 4: 55-62, 2003.
- (34) Iqbal S., Lenz H.J.: Integration of novel agents in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 54: 32-39, 2004.
- (35) Jaenicke R., Buchner J.: Protein folding: from unboiling an egg to catolysis of folding. *Chemtracts-Biochemistry and molecular Biology* 4: 1-30, 1993.
- (36) Jaenicke R.: Folding and associated versus misfolding and aggregation of proteins. *Phil Trans R Soc Lond. B* 348: 97-105, 1995.
- (37) Jager E., Jager D., Karbach J., Chen Y.T., Ritter G., Nagata Y., Gnjatich S., Stockert E., Arand M., Old L.J., Knuth A.: Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4 (+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J Exp Med.* 191: 625-630, 2000.
- (38) Janeway C.A., Travers P.: *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1997.

-
- (39) Kather A., Ferrara A., Nonn M., Schinz M., Nieland J., Schneider A., Durst M., Kaufmann A.M.: Identification of naturally processed HLA-A*0201 HPV18 E7 T cell epitope by tumor cell mediated in vitro vaccination. *Int J Cancer* 104: 345-353, 2003.
- (40) Kawana-Tachikawa A., Tomizawa M., Nunoya J., Shioda T., Kato A., Nakayama E.E., Nakamura T., Nagai Y., Iwamoto A.: An efficient and versatile mammalian vector system for major histocompatibility complex class I/ peptide complexes. *J Virol.* 76: 11982-11988, 2002.
- (41) Kiecke M.C., Cho B.K., Boder E.T., Kranz D.M., Wittrup K.D. : Isolation of anti -T cell receptor sc Fv mutants by yeast surface display. *Protein Engineering* 10: 1303-1310, 1997.
- (42) Kiecke M.C., Shusta E.V., Boder E.T., Teyton L., Wittrup K.D., Kranz D.M. : Selection of functional T cell receptors mutants from yeast surface display library. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96: 5651-5656, 1999.
- (43) Kong F.M., Ten Haken R., Eisbruch A., Lawrence T.S.: Non-small cell lung cancer therapy-related pulmonary toxicity: an update on radiation pneumonitis and fibrosis. *Semin. Oncol.* 32: 42-54, 2005.
- (44) Kondo A., Ueda M.: Yeast cell-surface display – applications of molecular display. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64: 28-40, 2004.
- (45) Kurokawa M.S., Ohoka S., Matsui T., Sekine T., Yamamoto K., Nishioka K., Kato T.: Expression of MHC class I molecules together with antigenic peptides on filamentous phages. *Immunol. Lett.* 80: 163-168, 2002.
- (46) Kushner S.R.: An improved method for transformation of *E. coli* with ColE1-derived plasmids. *Genetic Engineering*, pp. 17-23 Edited by H.B. Boyer & S. Nicosia. Amsterdam Elsevier.

-
- (47) Lederberg M., COHEN S.M.: Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *Bacteriol.* 199: 1072-4, 1974.
- (48) Le Doussal J., Piqueras B., Dogan I., Debre P., Gorochov G.: Phage display of peptide/major histocompatibility complex. *J. Immunol. Methods* 241: 147-158, 2000.
- (49) Lee L., Mc Hugh L., Ribaud R.K., Kozlowski S., Margulies D.H., Mage M.G.: Functional cell surface expression by a recombinant single-chain class I major histocompatibility complex molecule with a cis-active beta 2-mikroglobulin domain. *Eur. J. Immunol.* 24: 2633-2639, 1994.
- (50) Lis H., Sharon N.: Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.* 281: 1-27, 1993.
- (51) Livi G.P., Ferrara A.A., Roskin R., Simon P.L., Young P.R.: Secretion of N-glycosylated human recombinant interleukin-1 alpha in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 88: 297-301, 1990.
- (52) Lu C.F., Montijn R.C., Brown J.L., Klis F., Kurjan J., Bussey H., Lipke P.N.: Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell. Biol.* 128: 333-340, 1995.
- (53) Lybarger L., Yu Y.Y., Miley M.J., Fremont D.H., Myers N., Primeau T., Truscott S.M., Connolly J.M., Hanson T.H.: Enhanced immune presentation of a single-chain major histocompatibility complex class I molecule engineered to optimize linkage of a C-terminally extended peptide. *J. Biol. Chem.* 278: 27105-27111, 2003.
- (54) Ma H., Kunes S., Schatz P.J., Botstein D.: Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene*. 58: 201-216, 1987.

-
- (55) Madden D.R.: The three-dimensional structure of peptide-MHC-complexes. *Ann. Rev. Immunol.* 13: 587-622, 1995.
- (56) Mage M.G., Lee L., Ribaldo R.K., Corr M., Kozlowski S., McHugh L., Margulies D.H.: A recombinant, soluble, single-chain class I major histocompatibility complex molecule with biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 10658-10662, 1992.
- (57) Mallone R., Nepom G.T.: MHC Class II tetramers and the pursuit of antigen-specific T cells: define, deviate, delete. *Clinical Immunology* 110: 232-242, 2004.
- (58) Matzku S., Zoller M.: Specific immunotherapy of cancer in elderly patients. *Drugs Aging* 18: 639-664, 2001.
- (59) Mezard C., Pompon D., Nicolas A.: Recombination between similar but not identical DNA sequences during yeast transformation occurs within short stretches of identity. *Cell.* 70: 659-670, 1992.
- (60) Miller K.D., Weaver-Feldhaus J., Gray S.A., Siegel S.A., Siegel R.W., Feldhaus M.J.: Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 42: 255-267, 2005.
- (61) Monsurro V., Nagorsen D., Wang E., Provenzano M., Dudley M.E., Rosenberg S.A., Marincola F.M.: Functional heterogeneity of vaccine-induced CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 168: 5933-5942, 2002.
- (62) Mosolits S., Nilsson B., Mellsted B.: Towards therapeutic vaccines for colorectal carcinoma; a review of clinical trials. *Expert Rev. Vaccines* 4: 329-350, 2005.

-
- (63) Mottez E., Jaulin C., Godeau F., Choppin J., Levy J.P., Kourilsky P.: A single-chain murine class I major transplantation antigen. *Eur. J. Immunol.* 21: 467-471, 1991.
- (64) Mottez E., Langlade-Demoyen P., Gournier H., Martinon F., Maryanski J., Kourilsky P., Abastado J.P.: Cells expressing a major histocompatibility complex class I molecule with a single covalently bound peptide are highly immunogenic. *J. Exp. Med.* 181: 493-502, 1995.
- (65) Nakamura M., Iwahashi M., Nakamori M., Ueda K., Ojima T., Naka T., Ishida K., Yamue H.: Dendritic cells transduced with tumor-associated antigen gene elicit potent therapeutic antitumor immunity: comparison with immunodominant peptide-pulsed DCs. *Oncology* 68: 163-170, 2005.
- (66) Nakajou K., Watanabe H., Kragh-Hansen U., Maruyama T., Otagiri M.: The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serumalbumin as revealed by recombinant mutants. *Biochem Biophys Acta* 1623: 88-97, 2003.
- (67) Opdenakker G., Rudd P.M., Ponting C.P., Dwek R.A.: Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J.* 14: 1330-1337, 1993.
- (68) Orlean P., Kuranda M.J., Albright C.F.: Analysis of glykoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 194: 682-697, 1991.
- (69) Oved K., Lev A., Nog R., Segal D., Reiter Y.: Antibody – mediated targeting of human single-chain class I MHC with covalently linked peptides induces efficient killing of tumor cells by tumor or viral-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Immunol., Immunthr.* 54: 867-879, 2005.
- (70) Parham P.: Function and polymorphism of human leukocyte antigen-A, B, C molecules. *Am J Med.* 85: 2-5, 1988.

-
- (71) Parham P., Adams E.J., Arnett K.L.: The origins of HLA-ABC Polymorphism. *Immunol. Rev.* 143: 141-180, 1995.
- (72) Parmiani G., Castelli C., Dalerba P., Mortarini R., Rivoltini L., Marincola F.M., Anichini A.: Cancer immunotherapy with peptide-based Vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 805-818, 2002.
- (73) Penault-Llorca F., Etessami A., Bourhis J.: Principal therapeutic uses of monoclonal antibodies in onkology. *Cancer Radiotherapy*, 6 Suppl. 1, 24s-28s, 2002.
- (74) Pfreundschuh M.: Exploitation of the B cell repertoire for the Identification of human tumor antigens. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46: 3-7, 2000.
- (75) Prosnitz R.G., Chen Y.H., Marks L.B.: Cardiac toxicity following thoracic radiation. *Semin Oncol.* 32: 71-80, 2005.
- (76) Raymond C.K., Pownder T.A., Sexson S.L.: General method for plasmid construction using homologous recombination. *Biotechniques* 26: 134-138, 140-141, 1999.
- (77) Sahin U., Tureci O., Schmitt H., Cochlovius B., Johannes T., Schmits R., Stenner F., Luo G., Schobert I., Pfreundschuh M.: Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11810-11813, 1995.
- (78) Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B.; Erlich H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988.
- (79) Sanger F., Nicklen S., Coulson R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467, 1977.

-
- (80) Satthaporn S., Eremin O.: Dendritic cells (II): Role and therapeutic implication in cancer. *J.R., Coll. Surg. Edinb.* 46: 159-167, 2001.
- (81) Schumacher T., The Netherlands Cancer Institute, Department of Immunology, Amsterdam, 2004.
- (82) Swers J.S., Kellog B.A., Wittrup K.D.: Shuffled antibody libraries aerated by in vitro homologous recombination and yeast surface display. *Nucleic Acids Res.* 32:e36, 2004.
- (83) Schweickhardt R.L., Jiang X., Garone L.M., Brondyk W.H.: Structure-expression relationship of tumor necrosis factor receptor mutants that increases expression. *J. Biol. Chem.* 278: 28961-28967, 2003.
- (84) Seo N., Furukawa F., Tokura Y., Takigawa M.: Vaccine therapy for cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 17: 1467-1474, 2003.
- (85) Sgaramella V., Van de Sande J.H., Khorana H.G.: Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67: 1468-1475, 1970.
- (86) Shusta E.V., Holler P.D., Kieke M.C., Kranz D.M., Wittrup K.D.: Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering. *Nature Biotechnology* 18: 754-759, 2000.
- (87) Shusta E.V., Kieke M.C., Parke E., Kranz D.M., Wittrup K.D.: Yeast polypeptide fusion surface display levels predict thermal stability and soluble efficiency. *J. Mol. Biol.* 292: 949-956, 1999.
- (88) Soling A., Rainor N.G.: Dendritic cell therapy of primary brain tumors. *Mol. Med.* 7: 659-667, 2001.

-
- (89) Starwalt S.E., Masteller E. L., Bluestone J.A., Kranz D.M.: Direct evolution of a single-chain class II MHC product by yeast display. *Protein Engineering* 16: 147-156, 2003.
- (90) Statistisches Bundesamt Deutschland, Robert-Koch-Institut, Gesundheitsbericht für Deutschland, Pressestelle Wiesbaden, 1998.
- (91) Van Antwerp J.J., Wittrup K.D.: Fine affinity discrimination by yeast surface display and flow cytometry. *Biotechnol. Prog.* 16: 31-37, 2000.
- (92) Vest Hansen N., Ostergaard Pedersen L., Stryhn A., Buus S.: Phage display of peptide/major histocompatibility class I complexes. *Eur.J. Immunol.* 31: 32-38, 2001.
- (93) Vijayalekshmi S., George S.K., Andersson L.K., Kihlberg J., Baltzer L.: A surface exposed O-linked galactose residue destabilises the structure of a folded helix-loop-helix dimer. *Org Biomol Chem.* 1: 2455-2460, 2003.
- (94) Van Den Beuken T., Pieters H., Steukers M., Van der Vaart M., Ladner R.C., Hoogenboom H.R., Hufton S.E.: Affinity maturation of Fab antibody fragments by fluorescent-activated cell sorting of yeast-display libraries. *FEBS Lett.* 546: 288-294, 2003.
- (95) Wadle A., Mischo A., Imig J., Wüllner B., Hensel D., Wätzig K., Neumann F., Kubuschok B., Schmidt W., Old L.J., Pfreundschuh M., Renner C.: Serological identification of breast cancer-related antigens from a *Saccharomyces cerevisiae* display library. *Int. J. Cancer* 117: 104-113, 2005.
- (96) Wang H.C., Yang M.H., Shi Y.Y., Pang X.W., Yang X.W., Yang X.A., Peng J.R., Leng X.S., Chen W.F.: Screening and analysis of genes encoding hepatocellular carcinoma associated tumor antigens. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 13: 343-346, 2005.

-
- (97) Watzle M., Klis F., Tanner W.: Purification and chakterisation of the inducible a agglutinin of *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 7: 1483-1488, 1988.
- (98) Webb A.I., Dunstone M.A., Chen W., Aguilar M.I., Chen Q., Jackson H., Chang L., Kjer-Nielson L., Beddoe T., McCluskey J., Rossjohn J., Purcell A.W.: Functional and structural characteristics of NY-ESO-1-related HLA A2-restricted epitopes and the design of a novel immunogenic analogue. J. Biol. Chem., 279: 23438-23446, 2004.
- (99) Yeung Y.A., Wittrup K.D.: Quantitativ screening of yeast surface displayed polypeptide libraries by magnetic bead capture. Biotechnol. Prog. 18: 212-220, 2002.
- (100) Yoshimasu M.A., Tanaka T., Ahn J.K., Yada R.Y.: Effekt of N-linked glycosylation on the aspartic proteinase poreine pepsin from *Pichia pastoris*. Glycobiology 14: 417-429, 2004.
- (101) Yu YY., Netuschil N., Lybarger L., Connolly J.M., Hanson T.H.: Cutting Edge: Single chain trimers of MHC class I molecules from stable structures that potently stimulate antigen specific T cells and B cells. J. Immunol. 168: 3143-3149, 2002.
- (102) Zeitschrift "Krebs in Deutschland", Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch- Institut, 4. Ausg., 2004.
- (103) Zhu X., Bavari S., Ulrich R., Sadegh-Nasseri S., Ferrone S., Mc Hugh L., Mage M.G.: A recombinant single-chain human class II MHC molecule (HLA-DR1) as a covalently linked heterodimer of alpha chain, beta chain, and antigenic peptide, with immunogenicity in vitro and reduced affinity for bacterial superantigens. Eur. J. Immunol. 27: 1933-1941, 1997.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christoph Renner für die Überlassung des Themas, die freundliche Unterstützung bei der wissenschaftlichen Arbeit und der Erstellung der Dissertation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael Pfreundschuh für seinen Beistand und die Möglichkeit, die Dissertation im onkologischen Labor durchführen zu können.

Herrn Dr. Axel Mischo danke ich für die stets freundschaftliche und kompetente Betreuung während der gesamten Entstehung der Dissertation.

Ich danke allen Mitarbeitern des onkologischen Labors, die mich in die Techniken der Molekularbiologie eingeführt und bei meiner Arbeit unterstützt haben. Insbesondere danke ich Frau Gabi Carbon, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ganz herzlichen Dank an meine Freunde und an meine Familie, besonders an Markus und Ute, die alle ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:	Anne Litzenburger geboren am 21. September 1978 in Saarbrücken
---------------------------	--

Schulbildung:

08/1989 - 06/1998	Gymnasium Johanneum, Homburg
-------------------	------------------------------

Berufsausbildung:

09/1998 – 08/2001	Ausbildung zur Medizinisch-technischen Radiologieassistentin an der staatl. Lehranstalt zur Ausbildung techn. Assistenten, Universitätsklinik Homburg
-------------------	---

Hochschulbildung:

seit 10/2001	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
08/2003	Erste Ärztliche Prüfung
04/2008	voraussichtlich Zweite Ärztliche Prüfung

Dissertation:

seit 05/2004	Experimentelle Dissertation mit dem Thema <i>Konformationsanalyse von rekombinant exprimierten, zellwandständigen HLA A2-Komplexen auf <i>Saccaromyces cerevisiae</i></i> im Onkologischen Labor der Inneren Medizin I
--------------	---

Homburg, Mai 2007